

Botany Department, Indiana University, Bloomington

THE S-FACTOR SITUATION IN A SMALL SAMPLE OF AN *OENOTHERA*  
(*RAIMANNIA*) *HETEROPHYLLA* POPULATION \* \*\*

By

RALPH E. CLELAND

(Received May 6, 1960)

Heterozygosity with consequent hybrid vigor is maintained in *Oenothera* by two radically different mechanisms. Most of the euoenotheras utilize balanced lethals in large circles of chromosomes coupled with self pollination; certain other oenotheras, belonging to this or other subgenera, depend upon a self-incompatibility system involving S-factors and requiring open pollination. If the number of different S-factors in a population of the latter type is small, the chances of successful outcrossing will be reduced and a reproductive barrier of greater or lesser seriousness will be set up. It is of interest, therefore, to obtain information regarding the numbers of S-factors in such populations as a means of evaluating the effectiveness of self-incompatibility as an agent capable of giving to a species a high level of survival value.

EMERSON (1939, 1940) has demonstrated in the case of *Oe. organensis* the existence of a large number of S-factors in a relatively small population of plants. The present paper outlines an attempt to obtain evidence as to the multiplicity of S-factors in a population of *Oe. heterophylla*. In order not to make the task of analysis too monumental, the analysis has been confined to a small sample of plants.

The plants upon which this study is based came from seed collected by Dr. CHARLES B. HEISER, Jr., in 1949, at a point two miles south of Athens, Texas. The seed was derived from "two or three" individuals growing together as a part of a large population. In phenotypic characters, the material is typical of the genus as described by MUNZ (1935, p. 653).

Plants were grown from the original seed in 1950 and 1951. Four plants in 1950 and three plants in 1951 were examined cytologically. All had 7 pairs of chromosomes. Like other collections of *heterophylla* which have been studied (HECHT, 1950), this material proved to be self-sterile. Numerous attempts at selfing failed.

No crosses between individuals of the 1950 culture were made. In 1951, however, a few crosses were made, although it was not possible, owing to the pressure of other experiments, to cross each plant with every other one. From the few crosses made, it has been possible to determine the S-factor formula of most of the plants involved in these crosses, and the total number of S-factors present in them.

\* Dedicated to Professor Dr. FR. OEHLKERS on the occasion of his 70th birthday with respect and best wishes.

\*\* Supported by the Rockefeller Foundation.

The following crosses were made in 1951: plants  $1 \times 9$ ;  $8 \times 2$ ;  $8 \times 6$ ;  $8 \times 7$ ;  $8 \times 11$ ;  $8 \times 12$ ;  $10 \times 8$ . The  $F_1$  families from these crosses were given separate culture numbers and grown in 1953. So far as possible, every plant in each  $F_1$  family was crossed with every other plant in the family, and a record made of the cases where seed was set or failed to set. On the basis of these results, the number of S-factor classes present in each  $F_1$  culture was determined. One plant in each class in each  $F_1$  family was then crossed with one plant of each class in every other family and the presence or absence of seed set recorded. On the basis of these results, it was possible to determine the S-factor composition of most of the classes present in each  $F_1$  culture. A few  $F_1$  classes whose S-factor composition could not be definitely determined in this way were tested by growing the  $F_2$  from appropriate crosses between the plants being tested and other  $F_1$ s whose S-factor constitutions had been determined. Details of the reasoning follow.

Tables 1 and 2 will show the initial procedures followed. Table 1 gives the result of intercrossing the various  $F_1$  individuals derived from the initial cross 1951,

Table 1. Seed-set following crosses between individuals of 1953 Cult. no. 41 ( $F_1$  progeny of 1951: pl.  $1 \times 9$ )

$F_1$ plant no.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Class
1	—	—	—		+	+	—		+	+	—	—		+	—		A
2		—	—		+	+	—		+	+	—	—	+	+	—		A
3			—			+	—		+	+		—	+	+	—	+	A
4				—													
5					—	+	+		+	—	+	+	+	+	+	+	B
6						—	+		+	+	+	—	—	—	+	+	C
7							—		+	+		—	+				A
8																	
9									—			+	+	+	+	—	D
10										—							
11											—	—	+	+	—	+	A
12												—	+	+			A
13													—	—	+	+	C
14														—	+	+	C
15															—	+	A
16																—	D

plant  $1 \times 9$  (1953 culture no. 41). Table 2 gives the results of similar treatment following the initial cross 1951, plant  $8 \times 7$  (1953 culture no. 43). The  $F_1$  progenies of each of the other 1951 crosses were handled in the same way. The following numbers of  $F_1$  plants were intercrossed within the various  $F_1$  families.

(1951, $1 \times 9$ )	$F_1$ cult. no. 1953:41	15 plants
(1951, $8 \times 2$ )	$F_1$ cult. no. 1953:42	4 plants
(1951, $8 \times 7$ )	$F_1$ cult. no. 1953:43	10 plants
(1951, $8 \times 11$ )	$F_1$ cult. no. 1953:44	10 plants
(1951, $8 \times 12$ )	$F_1$ cult. no. 1953:45	11 plants
(1951, $10 \times 8$ )	$F_1$ cult. no. 1953:46	9 plants
(1951, $8 \times 6$ )	$F_1$ cult. no. 1953:47	12 plants

In Table 1, let  $F_1$  plant no. 1 equal S-factor class 41-A. Plants 2, 3, 7, 11, 12, 15 failed to set seed with plant 1 and with each other, and in other crosses behaved in the same manner as plant 1, and hence they all belonged to class 41-A. Plant 5



gave different results from plant 1, and therefore belonged to a second class—41-B. Plant 10 failed to set seed with plant 5, and otherwise behaved in the same manner as 5; it also belongs, therefore, to class 41-B. Plant 6 behaved differently from any of those mentioned above, and so belonged to class 41-C. Plants 13 and 14 also fell into this class. Plants 9 and 16 belonged to a fourth class—class 41-D. Thus, plants 1 and 9 of the 1951 culture gave, when crossed, four classes of progeny and hence differed in respect to both S-factors.

With respect to the cross between plants 8 and 7 of the 1951 culture (Table 2), it is seen that the following plants of the  $F_1$  behaved alike when they were crossed

Table 2. *Seed-set following crosses between individuals of 1953 Cult. no. 43*  
( $F_1$  progeny of 1951: pl. 8  $\times$  7)

$F_1$ plant no.	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	15	Class
1	—	+	—	—	+	—	+	—		+	—	A
2		—	+	+	—	+	—	+		—	+	B
3			—	—	+	—	+	—		+	—	A
4				—	+	—	+	—		+	—	A
5					—	+	—	+		—	+	B
7						—	+	—		+	—	A
8							—	+				B
9								—		+	—	A
10									+	—	+	B
11										—	+	B
15											—	A

with other plants in this  $F_1$  culture, and they failed to set seed with each other: 1, 3, 4, 7, 9, 15. These may all be designated class 43-A. Plants 2, 5, 8, 10, 11 also behaved alike, but differently from those in class 43-A. They may therefore be designated as class 43-B. Thus, it is seen that there were only two S-factor classes in the  $F_1$  progeny from the cross 1951, plant 8  $\times$  7. The two 1951 plants, therefore, had one S-factor in common.

Similar analyses were made of the progeny of each of the other 1951 crosses with the following results: 1951 plants 8 and 2 had no S-factors in common, since their progeny included 3 classes; the same was true of plants 8 and 11 (their  $F_1$  had 4 classes), 8 and 12 (4 classes), 8 and 10 (3 classes). Plants 8 and 6 had one S-factor in common (2 classes in  $F_1$ ). (Where 3 classes were present, 4 were to be expected, but one class failed to show up.)

Having determined the *number* of S-factor classes in each  $F_1$  progeny, all possible crosses were then made between the various classes in the different  $F_1$  families in order to determine the S-factor *composition* of each of the classes. The results obtained from these crosses are shown in Table 3, and on the basis of these results, S-factor composition was determined as follows:

Let 1951 plant 8 =  $S_1S_2$  and plant 2 =  $S_3S_4$ . In the progeny of the cross between them (1953 culture no. 42) let class 42-A =  $S_1S_3$ , 42-B =  $S_1S_4$ , 42-C =  $S_2S_3$ . Since class 42-A gave no seed with 44-C, the latter also had  $S_1S_3$ ; since one parent of 44-C was plant 8 ( $S_1S_2$ ), the other parent, plant 11, must have had  $S_3$ . Since 42-B gave no seed with 44-D, the latter had  $S_1S_4$ ; since one parent of 44-D was plant 8 ( $S_1S_2$ ), the other parent, plant 11, must have had  $S_4$ . Therefore,





1951 plant 11 had  $S_3S_4$ . Since 42-C gave no seed with 44-A, the latter had  $S_2S_3$ . The remaining class in culture 44 (44-B) must have had the only other possible combination realizable in the cross  $S_1S_2 \times S_3S_4$ , namely  $S_2S_4$ .

Since 44-B gave no seed with 43-A (1951, plant  $8 \times 7$ ), the latter had  $S_2S_4$ ; 1951 plant 7 must then have had  $S_4$ , and since it gave only two classes with  $S_1S_2$  (plant 8) the other gene in plant 7 was  $S_1$  or  $S_2$ . It is not possible to tell which of these was present in plant 7: in either case, the progeny of 1951 plant  $7 \times 8$  must have been composed of the two classes  $S_1S_4$  and  $S_2S_4$ . Since 43-A had  $S_2S_4$ , then 43-B must have had  $S_1S_4$ . Summarizing to this point,

1951 plant 8 = $S_1S_2$	1953 culture no. 42 (1951, $8 \times 2$ ) A = $S_1S_3$
plant 2 = $S_3S_4$	B = $S_1S_4$
plant 11 = $S_3S_4$	C = $S_2S_3$
plant 7 = $S_1S_4$ or $S_2S_4$	1953 culture no. 43 (1951, $8 \times 7$ ) A = $S_2S_4$
	B = $S_1S_4$
	1953 culture no. 44 (1951, $8 \times 11$ ) A = $S_2S_3$
	B = $S_2S_4$
	C = $S_1S_3$
	D = $S_1S_4$

Since 44-A gave no seed with 45-B (1951,  $8 \times 12$ ), the latter must have had  $S_2S_3$ , and 1951 plant 12 had  $S_3$ . Since 44-C gave no seed with 45-D, the latter must have had  $S_1S_3$ . Since 45-C set seed with 42-B ( $S_1S_4$ ) it could not have the composition  $S_1S_4$ ; since it set seed with 43-A ( $S_2S_4$ ), it could not have  $S_2S_4$ . It had to possess  $S_1$  or  $S_2$  from its  $S_1S_2$  parent (1951 plant 8), and consequently could not have received  $S_4$  from the other parent which, therefore, did not have  $S_4$ . Since 1951 plant 12 gave four classes of progeny with plant 8, it did not have  $S_1$  or  $S_2$ . It must have had, in addition to the  $S_3$  already determined, another S-factor—let us call it  $S_5$ . Plant 12 of the 1951 culture therefore had  $S_3S_5$ .

Class 45-A had, therefore,  $S_1S_5$  or  $S_2S_5$ . 45-C had one of these two also, the one not possessed by 45-A. No data available from  $F_1$  cultures could distinguish between these two classes, but it was possible by growing appropriate  $F_2$  crosses to make this distinction. For instance, crossing 45-A and 45-C with  $S_1S_3$  (e.g., 45-D) or  $S_2S_3$  (e.g., 44-A) would distinguish between them. Whichever class would give four classes with  $S_1S_3$  or two classes with  $S_2S_3$  would have the composition  $S_2S_5$ , and vice versa. Accordingly, the seed from the cross of 45-A with 45-D was grown in 1945. This cross yielded 3 classes of progeny, indicating that 45-A had  $S_2S_5$ . Other crosses confirmed this result. Consequently  $45-A = S_2S_5$  and  $45-C = S_1S_5$ .

Class 46-A set no seed with 44-D and therefore had the same composition ( $S_1S_4$ ). Consequently, 1951 plant 10 had  $S_4$ . Since culture no. 46 had three classes of progeny, the 1951 parents of this culture differed with respect to both S-factors; and since plant 8 had  $S_1S_2$ , the other parent, plant 10, did not have  $S_1$  or  $S_2$ . Did 1951 plant 10 have  $S_3$ ? If it did, then the cross between plant 10 and plant 8 ( $S_3S_4$  and  $S_1S_2$ ) would have yielded 4 classes of progeny,  $S_1S_3$ ,  $S_1S_4$ ,  $S_2S_3$ ,  $S_2S_4$ . Classes 46-B, and 46-C would have, in addition to  $S_1$  or  $S_2$ , either  $S_3$  or  $S_4$ . Both classes, however, set seed with all four of 44-A ( $S_2S_3$ ), 44-B ( $S_2S_4$ ), 44-C ( $S_1S_3$ ) and 44-D ( $S_1S_4$ ). Neither class, therefore, could have one of these formulae. Consequently, 1951 plant 10 did not have  $S_3$ .

Could 1951 plant 10 have had  $S_5$  ( $S_4S_5$ )? If it had this formula, the progeny of the cross between plant 10 and plant 8 would have included four classes—

$S_1S_4$ ,  $S_2S_4$ ,  $S_1S_5$ ,  $S_2S_5$ . We have seen that 46-A had  $S_1S_4$  and that neither 46-B nor 46-C could have the composition  $S_2S_4$ —if this formula was possible in culture no. 46, it would have to be the one for the missing 46-D. Consequently, 46-B and 46-C would have to possess, the one the  $S_1S_5$  formula, the other the  $S_2S_5$  formula. However, both 46-B and 46-C set seed with both 45-A ( $S_2S_5$ ) and 45-C ( $S_1S_5$ ). Consequently, neither of these classes could have either of these formulae. We may conclude, therefore, that plant 10 of the 1951 culture did not have  $S_5$ . It must have had an S-factor not previously represented—let us call it  $S_6$ . Plant 10 was  $S_4S_6$ . Then the progeny represented by culture no. 46 in 1953 included the following classes:  $S_1S_4$  (46-A),  $S_2S_4$  (must represent the missing class, 46-D),  $S_1S_6$ ,  $S_2S_6$ .

It was not possible to determine on the basis of data available from the  $F_1$  cultures, whether 46-B had  $S_1S_6$  and 46-C had  $S_2S_6$  or vice versa. Consequently, appropriate  $F_2$ s had to be grown. Whichever class (46-B or 46-C) gave four classes with 45-C ( $S_1S_5$ ), would have the formula  $S_2S_6$ ; the one which gave two classes in this cross would have the formula  $S_1S_6$ . Consequently, the progeny from the cross between 46-B and 45-C was grown in 1954. The progeny was found to have two classes. A cross between 46-B and 44-D ( $S_1S_4$ ) yielded but one class, which is not incompatible with this finding. Consequently, 46-B had  $S_1S_6$  and 46-C had  $S_2S_6$ .

The cross between 1951 plant 8 and plant 6 (1953 culture no. 47) yielded two classes, so plant 6 had  $S_1$  or  $S_2$ . One class in the  $F_1$  progeny (47-A) set no seed with 46-B and consequently had the same S-formula ( $S_1S_6$ ). The other class (47-B) set no seed with 46-C ( $S_2S_6$ ), so had this formula. Since both classes had  $S_6$ , this must have been present in 1951 plant 6, which then had the composition  $S_1S_6$  or  $S_2S_6$ . It is not possible to determine which of these formulae plant 6 had, since the same classes of progeny would have been produced in either case, when plant 6 was the male parent.

Finally, we have to consider 1951, plants 1 and 9. Since these gave four classes in  $F_1$ , when crossed, they had entirely different S-factors. The  $F_1$  class designated 41-A set no seed with 43-A or 44-B so had the same S-factor composition as these classes ( $S_2S_4$ ). Class 41-D set no seed with 42-A, 44-C, 45-D and so had the S-factor composition of these classes ( $S_1S_3$ ). The S-factors present in the two parents were, therefore,  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$ . The various possibilities for parents and  $F_1$  classes are as follows:

Possibility	Plant no. 1	Plant no. 9	Progeny (4 classes)			
a)	$S_1S_2$	$S_3S_4$	$S_1S_3$	$S_1S_4$	$S_2S_3$	$S_2S_4$
b)	$S_1S_3$	$S_2S_4$	$S_1S_2$	$S_1S_4$	$S_2S_3$	$S_3S_4$
c)	$S_1S_4$	$S_2S_3$	$S_1S_2$	$S_1S_3$	$S_2S_4$	$S_3S_4$
d)	$S_2S_3$	$S_1S_4$	$S_1S_2$	$S_2S_4$	$S_1S_3$	$S_3S_4$
e)	$S_2S_4$	$S_1S_3$	$S_1S_2$	$S_2S_3$	$S_1S_4$	$S_3S_4$
f)	$S_3S_4$	$S_1S_2$	$S_1S_3$	$S_2S_3$	$S_1S_4$	$S_2S_4$

Both 41-B and 41-C set seed when crossed with  $S_1S_4$  (42-B) and  $S_2S_3$  (44-A). Neither 41-B nor 41-C could therefore have either of these formulae. Consequently, possibilities (a) and (f) are eliminated. Possibilities (b) and (e) are eliminated because they do not permit the presence in  $F_2$  of the two S



formulae shown already to exist, namely,  $S_2S_4$  (41-A) and  $S_1S_3$  (41-D). Possibilities (c) and (d) remain and 1951 plant 1 had  $S_1S_4$ , with plant 9 having  $S_2S_3$ , or the reverse was true. There is no way of telling which plant had which formula, since in either case, the progeny would be the same. It was possible to determine, however, whether 41-B had  $S_1S_2$  and 41-C had  $S_3S_4$  or vice versa, by growing the  $F_2$  progeny from crosses of each of these two classes, with such a class as 45-A ( $S_2S_5$ ). Whichever class would give four classes with 45-A would have the composition  $S_3S_4$ , the other class would have  $S_1S_2$ .

These  $F_2$ s were grown in 1954, but not enough plants bloomed to make an adequate test. It was, therefore, not determined whether 41-B was  $S_1S_2$  and 41-C was  $S_3S_4$  or whether the reverse was true.

The following is a summary of the S-factor composition of 1951 and 1953 cultures so far as determined:

1951 plant 1	$S_1S_4$ or $S_2S_3$	1953 culture no. 41 (1951, $1 \times 9$ )	A = $S_2S_4$
plant 2	$S_3S_4$		B = $S_1S_2$ or $S_3S_4$
plant 6	$S_1S_6$ or $S_2S_6$		C = $S_1S_2$ or $S_3S_4$
plant 7	$S_1S_4$ or $S_2S_4$		D = $S_1S_3$
plant 8	$S_1S_2$		
plant 9	$S_1S_4$ or $S_2S_3$	1953 culture no. 42 (1951, $8 \times 2$ )	A = $S_1S_3$
plant 10	$S_4S_6$		B = $S_1S_4$
plant 11	$S_3S_4$		C = $S_2S_3$
plant 12	$S_3S_5$		
		1953 culture no. 43 (1951, $8 \times 7$ )	A = $S_2S_4$
			B = $S_1S_4$
		1953 culture no. 44 (1951, $8 \times 11$ )	A = $S_2S_3$
			B = $S_2S_4$
			C = $S_1S_3$
			D = $S_1S_4$
		1953 culture no. 45 (1951, $8 \times 12$ )	A = $S_2S_5$
			B = $S_2S_3$
			C = $S_1S_5$
			D = $S_1S_3$
		1953 culture no. 46 (1951, $10 \times 8$ )	A = $S_1S_4$
			B = $S_1S_6$
			C = $S_2S_6$
		1953 culture no. 47 (1951, $8 \times 6$ )	A = $S_1S_6$
			B = $S_2S_6$

### Discussion

From a small sample of seed obtained from only "two or three" plants of *Oe. (Raimannia) heterophylla*, a total of six S-alleles have been recovered. It is probable that some of these alleles were contributed by pollen brought to these plants from surrounding plants.

The plants from which this seed was collected were members of a large population. If such a small sampling as this yields as many as six alleles, it is probable that a very large number of alleles are present in the population as a whole. With a variety of S-factors present in the immediate vicinity of a given plant, self-sterility in an open pollinated species should not constitute a significant reproductive barrier. This was amply demonstrated in the experimental garden, where every *heterophylla* plant that flowered in each generation became, as a result of insect activity, crowded with well-filled capsules.

*Oenothera* has developed two very diverse, but highly effective methods of ensuring a high degree of heterosis. In *Euoenothera* and in many species of *Raimannia*, as well as in certain species of other subgenera such as *Hartmannia* and *Anogra*, large circles coupled with balanced lethals have brought about a continuing heterozygosity resulting in a maximum of hybrid vigor. In other species, such as *rhombipetala* and *heterophylla* among the *Raimannias*, in *missouriensis* (*Megapterium*) and in species of *Anogra*, *Pachylophis*, *Lavauxia* and *Euoenothera* (*organensis*), the presence of S-factors associated with open pollination has accomplished essentially the same thing. While heterozygosity of S-factors does not imply heterozygosity of other factors, the enforced out-crossing brought about by the S-factors certainly encourages an approach to as high a degree of heterozygosity as is permitted by the genetic material available. The *heterophylla* system has one great advantage over the *Euoenothera* system in that it permits unrestricted gene flow and therefore affords an open road to further evolutionary development, whereas the *Euoenothera* method places definite barriers in the way of further evolution.

Both the *Euoenothera* system and the *heterophylla* system have potential disadvantages that must be overcome if the races adopting them are to survive. The dependence of *Euoenothera* on balanced lethals to preserve heterozygosity has the disadvantage not only of restricting gene flow, but also of introducing a high degree of gametophytic and/or zygotic sterility. This would be a great handicap if it were not for the development of the self pollinating habit, which ensures heavy seed set and thus tends to offset the sterilizing effect of the lethals. The enforcement of outcrossing by S-factors, on the other hand, introduces a hazard in that the race becomes dependent upon the activity of insects. If the population is large, and plants are relatively closely spaced, pollination will likely occur, but the probability of pollination will decrease rapidly with increased sparsity of the population. Furthermore, outcrossing resulting from the presence of S-factors would be hazardous indeed if there existed only a few S-factor combinations in the population. In that case, a considerable proportion of the population would have the same S-factor combination, and this would increase the chances considerably of bringing to a plant incompatible pollen. *Oe. heterophylla*, however, and other self-incompatible *Oenotheras*, have survived because they have been able to develop large numbers of S-factors. As a result a relatively small proportion of the plants of a population will have identical S-factor constitutions. Hence the chances are very high that pollen brought to a plant from outside will come from a plant compatible with this plant. The great diversity of S-alleles in the population is one of the most important factors, therefore, in making possible the continuance of the S-factor self-incompatibility system.

### Summary

Seed obtained from two or three individuals in an extensive *heterophylla* population produced plants with a total of six S-factors. The number of different S-factors in the population as a whole is probably very large, and this increases very greatly the likelihood of successful pollinations among the individuals of this self-incompatible race.



### Literature Cited

- EMERSON, S.: A preliminary survey of the *Oenothera organensis* population. *Genetics* **24**, 524—537 (1939).
- EMERSON, S.: Growth in incompatible pollen tubes in *Oenothera organensis*. *Bot. Gaz.* **101**, 890—911 (1940).
- HECHT, A.: Cytogenetic studies of *Oenothera*, subgenus *Raimannia*. In *Studies in Oenothera cytogenetics and phylogeny*. Indiana Univ. Publ. Sci. **16**, 255—304 (1950).
- MUNZ, P.: Studies in *Onagraceae*. IX. The subgenus *Raimannia*. *Amer. J. Bot.* **22**, 645—663 (1935).

Dr. RALPH E. CLELAND,  
Botany Department, Indiana University Bloomington (Indiana) U.S.A.

Aus dem Botanischen Institut der Universität Köln

## VERGLEICH DES EIWEISSANTEILES DES WILDSTAMMES VOM TABAKMOSEKIVIRUS MIT DEM EINER TEMPERATURMUTANTE

Von

H. G. AACH

(Eingegangen am 12. Mai 1960)

In einer früheren Arbeit war bei zwei verschiedenen Wildstämmen des Tabakmosaikvirus (TMV) und vier sich davon ableitenden Mutanten die chemische Zusammensetzung ihrer Eiweißanteile untersucht worden. In allen Fällen wurden parallel mit der mutativen Symptomänderung ganz geringfügige Änderungen in der Aminosäurezusammensetzung des Virusproteins aufgefunden, während die beiden Wildstämme in einer ganzen Reihe von Aminosäuren untereinander verschieden waren (AACH 1958a). — Hier soll von einer weiteren Mutante und dem Vergleich ihrer Eiweißzusammensetzung mit der des Ausgangstammes berichtet werden. Eine serologische Untersuchung dieser beiden Virusstämme ist bereits vorausgegangen (AACH 1957). Durch den Erschöpfungstest konnte auf der Temperaturmutante eine Antigenspezifität nachgewiesen werden, die dem Wildstamm fehlte.

### Das Virusmaterial

Von dem Wildstamm *vulgare* stand eine Mutante zur Verfügung, die von *vulgare*-infizierten Tabakpflanzen in Kultur bei 35° C isoliert wurde: *thermophilum*. Diese Isolierung war anfangs sehr uneinheitlich (MELCHERS unveröff., AACH 1957, KRAMER 1957), was unter anderem darin zum Ausdruck kam, daß beim Rückverbringen von Impflösung auf Tabakpflanzen unter Gewächshausbedingungen stets wieder Rückschläge der Symptome in *vulgare*-ähnliche zu beobachten waren. Der *vulgare*-Stamm wird nämlich bei einer Vermehrung bei 35° C nicht inaktiviert (vgl. KASSANIS 1957); die unter den warmen Kulturbedingungen kaum erkennbaren *vulgare*-Symptome werden von denen der Temperaturmutante verdeckt. Die Symptome von *thermophilum* sind bei 35° C die eines stark pathogenen Gelbstammes, der gleichzeitig eine Verstümmelung der Blattgestalt bewirkt. Bei der Kultur *thermophilum*-infizierter Pflanzen zwischen 20 und 25° C ist dagegen die Entwicklung so gut wie überhaupt nicht gehemmt und eine Schädigung des Chlorophyllapparates kaum zu beobachten. Unter diesen Bedingungen sind dann die Symptome des Wildstammes leicht zu erkennen, der bei normaler Gewächshaustemperatur ein kräftiges Hellgrün-Dunkelgrün-Mosaik hervorruft.

Um den Stamm *thermophilum* zu „reinigen“, insbesondere um ihn von beigemischtem *vulgare*-Material zu befreien, wurden folgende Schritte unternommen:

1. 16 Std Dialyse des *thermophilum*-Impfmateri als in m/50 Phosphatpuffer pH 8,0, um eventuell vorhandene Virusaggregate und Dimere zu spalten.

2. Beimpfung der Primärblätter von je 5 Pflanzen *Phaseolus vulgaris* mit Viruskonzentrationen  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  und  $10^{-9}$  g/ml. Nach 10 Tagen Weiterkultur in der Klimakammer bei 35° C und 80% Feuchte wurden insgesamt an Einzelherden gezählt:

Impflösung	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$
Nekrosen	107	14	2	0

3. Die beiden Einzelherde, A und B, aus der Grenzkonzentration  $10^{-8}$  g/ml wurden isoliert und auf je eine Java-Tabakpflanze (s. MELCHERS u. a. 1940) verimpft, die bei 35° C weitergezogen wurde. Nach 4 Tagen zeigten die infizierten Pflanzen die typischen frühen Sekundärsymptome: Aufhellen der Adern und Verblässen des Chlorophylls in den jungen Blättern.



4. Nach weiteren 4 Tagen wurde je ein junges Blatt der beiden Pflanzen in 5 ml m/15 Phosphatpuffer pH 7.2 zerrieben. Je 5 Xanthi-Tabakpflanzen (TAKAHASHI 1956) wurden mit dieser Impflösung 1:1, 1:10 und 1:100 infiziert und bei 35° C weiterkultiviert. Diese Pflanzen bildeten jedoch bei 35° C keine nekrotischen Primärsymptome aus (vgl. SAMUEL 1931, KASSANIS 1952).

5. Sie wurden deshalb 2 Tage nach der Beimpfung für eine Nacht bei 18° C gehalten. Jetzt konnten sowohl von dem A- als auch von dem B-Material je 5 einzeln stehende Nekroseherde isoliert werden, die auf Samsun-Tabakpflanzen in 35°-Kultur weiter verimpft wurden. Diese Pflanzen zeigten auch nach vierwöchiger Kultur keine Symptomminderungen.

6. Je ein Blatt einer mit A- und einer mit B-Material infizierten Pflanze diente zur Herstellung der Impflösungen für die Vermehrungen des zu analysierenden *thermophilum*-Stammes.

Infiziert wurden je 12 Samsun-Tabakpflanzen, die im Gewächshaus bei 18—25° C kultiviert wurden. Kontrollinfektionen, die gleichzeitig in einer Klimakammer bei 35° C gezogen wurden, zeigten einheitlich die beschriebenen, kräftigen Gelbsymptome, die für *thermophilum* typisch sind. Die 24 Pflanzen im Gewächshaus zeigten nach etwa fünfwöchiger Kultur einheitlich unauffällige, sehr schwache TMV-Symptome an den Spitzenblättern. Von je zwei Pflanzen wurden aus dieser Spitzenregion Blätter als Impfmateriel für weitere 60 Samsun-Tabakpflanzen entnommen. Auch auf diesen war nach 8 Wochen in keinem Fall ein Rückschlag in die Wildstammsymptome zu beobachten, so daß man das *thermophilum*-Material aus der ersten Vermehrung, das zur Analyse diente, als frei vom Ausgangstamm ansehen kann.

Das *vulgare*-Impfmateriel wurde ebenfalls gereinigt: Nach 16stündiger Dialyse bei pH 8,0 erfolgten 2 Passagen über Einzelherde aus Viruslösungen, die bis zur Infektionsgrenze verdünnt waren. Die Vermehrung erfolgte dann auf Samsuntabak.

## Methoden

Die Viruspräparate wurden nach dem Auftauen der eingefrorenen Blätter durch Zerschlagen des Blattgewebes im Mixer, Säurefällung aus dem Überstand und abwechselnd hoch- und niedertouriges Zentrifugieren mit zwischenzeitlichem Einfrieren gewonnen (AACH 1960).

Die Ausbeuten betrugen im Versuch A 0,23 %, im Versuch B 0,20 %.

Nach der Entfernung der Nukleinsäure durch 30 min Behandlung mit 5 % Trichloressigsäure bei 90° C und Säurehydrolyse des Eiweißes wurden die Aminosäuren mittels der chromatographischen Methode von LEVY analysiert; der Vergleich der Tryptophanwerte wurde auf Grund spektralphotometrischer Messung am Viruseiweiß vorgenommen (AACH 1958b).

## Die Analysenergebnisse

Von den Vermehrungen der zwei *thermophilum*-Isolate standen je sechs Analysen zur Verfügung. Zwischen den beiden parallelen Analysenreihen traten keine signifikanten Unterschiede auf. Sie wurden deshalb in der Spalte 3 der Tabelle zusammen aufgeführt und der gleichen Anzahl von *vulgare*-Analysen in Spalte 2 gegenübergestellt. In der Spalte 4 wurde die Varianz der Werte innerhalb der Stämme mit der Varianz zwischen den beiden Stämmen verglichen (F-Wert). Auf Grund der angegebenen P-Werte ergibt sich ein gesicherter Unterschied zwischen den beiden Stämmen in der Threonin- und in der Leuzinkonzentration<sup>1</sup>. Und zwar ist der Threoningehalt von *thermophilum* gegenüber dem von *vulgare* erhöht, der Leuzingehalt<sup>1</sup> dagegen herabgesetzt. Wenn wir die Differenz auf die Grundeinheit des TMV-Proteins vom Molekulargewicht 17500 beziehen,

<sup>1</sup> oder Isoleuzin, da die beiden Isomeren durch die angewandte chromatographische Methode nicht getrennt werden.

ergibt sich, daß parallel mit der Mutation *vulgare* → *thermophilum* je 17500-Polypeptid die Threoninreste um 1,2 mehr und die Leuzinreste<sup>1</sup> um 0,85 weniger geworden sind.

Tabelle. Vergleich der Aminosäurezusammensetzung (Mol-%) der Eiweißhülle des TMV-Wildstammes *vulgare* mit der der Temperaturmutante *thermophilum*; beide Stämme aus Gewächshauskultur. (Berechnet unter Benutzung der Faktoren von LEVY.)

Aminosäuren	<i>vulgare</i>	<i>thermophilum</i>	Varianzen-Verhältnis F-Wert*
Asp	11,81 ± 0,12	11,85 ± 0,17	< 1
Glu	9,78 ± 0,08	10,07 ± 0,11	< 1
Cys	0,57	0,53	**
Ser	9,18 ± 0,17	8,94 ± 0,21	< 1
Thr	9,45 ± 0,12	10,29 ± 0,14	44,68
Gly	3,41 ± 0,05	3,48 ± 0,07	3,58
Ala	8,53 ± 0,11	8,61 ± 0,28	3,21
Pro	5,65 ± 0,09	5,51 ± 0,10	4,99
Val	8,88 ± 0,17	9,17 ± 0,25	1,03
Leu + Ileu	14,51 ± 0,45	13,38 ± 0,43	16,84
Phe	5,47 ± 0,09	5,46 ± 0,11	< 1
Tyr	2,44 ± 0,29	2,44 ± 0,29	1,08
Lys	1,32 ± 0,12	1,37 ± 0,13	1,06
Arg	6,75 ± 0,20	6,89 ± 0,43	1,89
Try***	1,93	1,82	**

\* Für die Grenzwahrscheinlichkeit  $P = 0,01$  ist  $F = 7,9$ ;  
für die Grenzwahrscheinlichkeit  $P = 0,05$  ist  $F = 4,3$ .

\*\* Nicht berechnet.

\*\*\* Spektralphotometrisch ermittelt.

Ausgangstammes *vulgare* gehemmt ist, gelang es, die Mutante rein zu erhalten. Diese unabdingliche Voraussetzung eines analytischen Vergleiches wurde durch Weitervermehrung des Impfmateri als unter Gewächshausbedingungen geprüft. Der *vulgare*-Stamm wurde vor Versuchsbeginn ebenfalls einer Reinigung durch Einzelherdpassagen unterworfen, so daß auch hier die erforderliche Reinheit des Ausgangsmateri als gewährleistet war.

In einer früheren Untersuchung war zwischen *thermophilum* und *vulgare* bereits ein Unterschied in der serologischen Spezifität aufgefunden worden. Dieser ließ sich jedoch nur bei *thermophilum*-Präparaten nachweisen, die bei 35° C vermehrt waren (AACH 1957). Das Fehlen des spezifischen Antigens in *thermophilum*-Präparaten aus Gewächshauskultur ist durch das seinerzeit noch nicht genügend gereinigte Impfmateri als zu erklären.

Die Aminosäureanalyse ergab einen gesicherten Unterschied zwischen den Stämmen *thermophilum* und *vulgare* nur in dem Anteil von Threonin und Leuzin. — Bereits 1958 hatten wir derartige Aminosäureunterschiede auf die Untereinheiten des TMV-Proteins bezogen, von deren Größe man auf Grund der Endgruppenbestimmungen von HARRIS u. KNIGHT eine recht genaue Vorstellung hatte. Dabei ergaben sich fast ganzzahlige Verhältnisse für die Aminosäureanteile. Außerdem kompensierten sich die Differenzen zwischen den Mutanten gegenseitig, so daß eine einheitliche Größe für die Eiweißbausteine aller Mutanten angenommen

<sup>1</sup> s. Anmerkung S. 313.

### Besprechung der Ergebnisse

Die Temperaturmutante *thermophilum*, ein Gelbstamm des TMV, dessen Aminosäurezusammensetzung mit der des Wildstammes *vulgare* verglichen wurde, stammte aus einem gelben Fleck, wie sie auf den Blättern *vulgare*-infizierter Tabakpflanzen bei einer Kulturtemperatur von 35° C in starkem Maße auftreten (MUNDRY 1957). Durch mehrfache Passagen über verschiedene Wirtspflanzen stets bei einer Temperatur von 35° C, unter der die Vermehrung des



werden konnte. Werden die parallel zur Mutation *vulgare*  $\rightarrow$  *thermophilum* aufgefundenen Veränderungen in der Eiweißzusammensetzung auf die Polypeptidkette vom Molekulargewicht 17500 bezogen, ergibt sich ein Austausch einer Aminosäure: Einer der 20 Leuzin- oder Isoleuzinreste des Wildstammes ist gegen einen Threoninrest ausgetauscht, deren Anzahl sich dadurch auf 17 je Peptidkette erhöht (vgl. WITTMANN u. BRAUNITZER 1959). Da die beiden isomeren Aminosäuren bei der Analysenmethode von LEVY nicht getrennt werden, ist noch nicht zu entscheiden, ob die Differenz im Leuzin- oder im Isoleuzin-gehalt besteht.

Ähnlich einfache Änderungen wurden bei der Eiweißanalyse anderer TMV-Mutanten aufgefunden und sind bereits früher beschrieben (AACH 1958a). Diese Befunde, in denen eine Mutation beim TMV (=Veränderung der Nukleinsäure) gleichzeitig zu einer Änderung der Aminosäurezusammensetzung führte, zeigten erstmalig analytisch den vielfach postulierten Zusammenhang zwischen der RNS und einem ihr zugeordneten Protein. Die Tatsache, daß die beschriebenen Abänderungen sich bei den Mutanten in jeder Untereinheit wiederholten, zeigte, daß das der TMV-RNS primär zuzuordnende Protein nicht etwa durch das Gesamteiweiß, sondern lediglich durch eine Untereinheit, durch die Polypeptidkette vom Molekulargewicht 17500 verkörpert wird. Setzen wir die Zahl 157 der Aminosäuren einer Untereinheit (WITTMANN u. BRAUNITZER) zu den 6000 Nukleotiden der TMV-RNS, die eine biologische Einheit darstellen (GIERER), in Beziehung, so entfallen etwa im Durchschnitt 40 Nukleotide auf eine Aminosäure.

Bei einem solchen Verhältnis stehen aber auf der Seite der Nukleotide erheblich mehr Variationsmöglichkeiten zur Verfügung als auf der Seite der Aminosäuren. Eine ganze Anzahl unter sich verschiedener Nukleotidsequenzen würde dann die gleiche Aminosäuresequenz bedingen, und entsprechend könnte man Nukleinsäureveränderungen erwarten, die keine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge hätten. Tatsächlich sind schon einige Male Analysendaten von TMV-Mutanten veröffentlicht (KNIGHT 1947 u. 1959, WITTMANN 1959), die keine Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung erkennen lassen. Obwohl keine der betreffenden Analysen bisher so vollständig durchgeführt ist, daß man Unterschiede in der Eiweißstruktur der jeweils verglichenen Stämme restlos ausschließen kann<sup>1</sup>, müssen wir also doch damit rechnen, daß für die Aminosäurezusammensetzung nur bestimmte Nukleotide innerhalb der Nukleinsäure oder nur ein Teilstück der Virus-RNS verantwortlich ist.

Andererseits ist es aber überhaupt noch unbekannt, ob nicht auch die Wirtszelle während der Synthese der TMV-Partikeln einen Einfluß auf die Aminosäurezusammensetzung des Hüllenproteins ausüben kann. Versuche zur Beantwortung dieser Frage sind jedoch bereits im Gange.

Diese Arbeit wurde im Jahre 1957 im Max Planck-Institut für Biologie, Abt. MELCHERS, in Tübingen begonnen. Herrn Professor Dr. MELCHERS danke ich für die Überlassung des Ausgangsimpfmateri als. Der „Deutschen Forschungsgemeinschaft“ danke ich für eine finanzielle Unterstützung, Fräulein C. BREUER und Fräulein I. MENSING für die Hilfe bei den Laborarbeiten.

<sup>1</sup> Selbst die Peptidanalysen von WITTMANN lassen die Möglichkeit von Differenzen im Amidierungsgrad und von Umstellungen der Aminosäuren innerhalb der tryptischen Peptide offen.

### Summary

The protein of the common strain *vulgare* of tobacco mosaic virus was compared analytically with the protein of a temperature-mutant *thermophilum*. The latter was isolated from tobacco plants which were infected with common TMV and cultured at 35° C. Per polypeptid chain of 17500 molecular weight the protein of the mutation strain contained one threonine residue more and one isoleucine (or leucine) residue less than common TMV protein.

### Literatur

- AACH, H. G.: Serologische Untersuchungen an Mutanten des TMV. Z. Naturforsch. **12b**, 614 (1957).
- AACH, H. G.: Quantitative Aminosäureanalysen an Mutanten des TMV. Z. Naturforsch. **13b**, 425 (1958a).
- AACH, H. G.: Spektralphotometrische Untersuchungen an Mutanten des TMV. Z. Naturforsch. **13b**, 165 (1958b).
- AACH, H. G.: Die Viren. In Handbuch der Biologie, Bd. 1, S. 287. 1960.
- GIERER, A.: Die Größe der biologisch aktiven Einheit der RNS des TMV. Z. Naturforsch. **13b**, 485 (1958).
- HARRIS, J. I., and C. A. KNIGHT: Action of carboxypeptidase on TMV. Nature (Lond.) **170**, 613 (1952).
- KASSANIS, B.: Some effects of high temperature on the susceptibility of plants to infection with virus. Ann. appl. Biol. **39**, 358 (1932).
- KASSANIS, B.: Effects of varying temperature on the quality and quantity of TMV in infected plants. Virology **4**, 187 (1957).
- KNIGHT, C. A.: The nature of some of the chemical differences among strains of TMV. J. biol. Chem. **171**, 297 (1947).
- KNIGHT, C. A.: Plant pathology: Problems and progress 1908—1958, p. 470. Madison: University Wisconsin Press 1959.
- KRAMER, E.: Elektrophoretische Untersuchungen an Mutanten des TMV. Z. Naturforsch. **12b**, 609 (1957).
- LEVY, A. L.: A paper chromatographic method for the quantitative estimation of amino acids. Nature (Lond.) **174**, 126 (1954).
- MELCHERS, G., G. SCHRAMM, H. TRURNIT u. H. FRIEDRICH-FREKSA: Die biologische, chemische und elektronenmikroskopische Untersuchung eines Mosaikvirus aus Tomaten. Biol. Zbl. **60**, 524 (1940).
- MUNDRY, K. W.: Die Abhängigkeit des Auftretens neuer Virusstämme von der Kulturtemperatur der Wirtspflanzen. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **88**, 407 (1957).
- SAMUEL, G.: Some experiments on inoculation methods with plant viruses. Ann. appl. Biol. **18**, 494 (1931).
- TAKAHASHI, W. N.: Increasing the sensitivity of the local-lesion method of virus assay. Phytopathology **46**, 654 (1956).
- WITTMANN, H. G.: Vergleich der Proteine des Normalstamms und einer Nitritmutante des TMV. Z. Vererb.-Lehre **90**, 463 (1959).
- WITTMANN, H. G., and G. BRAUNITZER: Isolation and composition of all tryptic peptides of TMV. Virology **9**, 726 (1959).

Dr. H. G. AACH, Köln-Lindenthal, Gyrhofstraße 15



Aus der Abteilung für Mikrobiologie des Botanischen Institutes der Universität Köln

## GENETISCHE UND PHYSIOLOGISCHE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEN BAKTERIOPHAGEN T1 UND D 20

Von

THOMAS A. TRAUTNER

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. August 1960)

Der Phage T 1 gehört zu der bekannten T-Serie der Coliphagen. D 20 — erstmalig von BURNET (1953) beschrieben — ist kein Coliphage, sondern vermehrt sich bevorzugt auf Shigellen. Mit dem Ziel einer systematischen Klassifizierung von Bakteriophagen wurden von ADAMS und WADE (1955) vergleichende Untersuchungen an den beiden Phagen durchgeführt. Es konnte eine große Ähnlichkeit zwischen T 1 und D 20 in verschiedenen Eigenschaften (Morphologie, serologisches Verhalten, Inaktivierbarkeit usw.) festgestellt werden. ADAMS schlug vor, die Phagen als verschiedene Stämme einer Bakteriophagenspezies zu klassifizieren. T 1 und D 20 unterscheiden sich in ihrem Wirtsbereich, d. h. in ihrer Vermehrungsfähigkeit auf verschiedenen Bakterien. Das Fehlen eines gemeinsamen Bakterienwirtes, der eine Kreuzung ermöglicht hätte, erlaubte jedoch keinen genetischen Vergleich zwischen diesen Phagen. In der vorliegenden Arbeit wird über Versuche berichtet, die Aufschlüsse über die genetischen und physiologischen Beziehungen von T 1 und D 20 geben.

### Material

**Bakterien:** *Escherichia coli* B und verschiedene phagenresistente Mutanten; SF, ein von M. H. ADAMS übersandter Wirtsstamm für D 20;

**Phagen:** Verschiedene T1 Mutanten, beschrieben bei BRESCH und MENNIGMANN (1954); D 20 von M. H. ADAMS übersandt.

**Medien:** zur Herstellung von Lysaten, Bakterienkulturen usw.: „Bouillon“ = Peptonwasser (Merck) (1%) + 0,6 g NaCl/l; pH 7,3; zur Durchführung von Kreuzungen, Adsorptionsmessungen: entweder Bouillon oder synthetisches Medium nach WATSON zit. bei BENZER (1952). Plattierungen: auf Farbagarplatten, Technik beschrieben bei BRESCH und TRAUTNER (1954).

**Antiserum:** Anti-D 20-Serum aus Kaninchen, hergestellt von Dr. ELINOR MEYNELL (London).

### Genetische Charakterisierung von D 20

Der Wirtsbereich von T1 und D 20 ist in Tabelle 1 mit den entsprechenden Wirkungsgraden der Plattierung (efficiency of plating) wiedergegeben.

Allein eine Mischinfektion von *E. coli* B durch T1 und D 20 sollte danach geeignet sein, eventuelle Rekombinationsvorgänge zwischen beiden Phagen aufzuzeigen. Hierzu wurden T1 und D 20 in gleichen Mengen mit Bakterien gemischt. Nach Eliminierung nichtadsorbierter Phagen durch Zentrifugation wurden die infizierten Zellen vor dem Ende der Latenzperiode (13 min) mit einer Bakterienmischung B + SF plattiert. Auf etwa 1000 Infektionszentren, die auf Zellen zurückzuführen waren, die nur einen Phagentyp (meistens T1) vermehrt hatten,

fand sich ein Phagenloch, das offenbar von einer Zelle stammte, in der sich beide Phagen vermehrt hatten. Derartige Mischlöcher wurden abgeimpft und zur Feststellung der in ihnen enthaltenen Phagentypen erneut auf B + B/1 + SF ausplattiert. Dabei zeigte es sich, daß die Mischlöcher neben beiden Elterntypen zwei neue enthielten, die in ihrem Wirtsbereich eine Zwischenstellung zwischen T1 und D20 einnahmen: In Beziehung auf den Wirtsbereich von D20 hatte der eine

Tabelle 1. Wirtsbereich und e. o. p. verschiedener Phagen gegen-  
über verschiedenen Bakterienstämmen.

Zur Ermittlung der e. o. p. wurden aliquote Mengen von Phagen mit verschiedenen Bakterien ausplattiert. Der Zählwert (etwa 500 Phagenlöcher) auf B (für *Ds*<sup>+</sup>) und SF (für *Ds*) wurde gleich 1 gesetzt. Die Angabe „—“ bedeutet e. o. p. < 10<sup>-4</sup>.

	B	B/1	B/ <i>Ds</i>	B/ <i>Ha</i>	B/1, <i>Hr</i>	SF
T1 wild	1	—	—	1	—	—
<i>HrDs</i> <sup>+</sup>	1	0,72	0,72	1	—	—
„D20“ = <i>HaDs</i>	0,13	0,19	0,16	—	0,08	1
<i>HaDs</i> <sup>+</sup>	1	1,30	1,30	—	1	—
<i>Ha</i> <sup>+</sup> <i>Ds</i>	1	—	—	1	—	1

die Fähigkeit verloren, SF zu lysieren, der andere die Fähigkeit B/1 zu lysieren (vgl. Tabelle 1). Dieses Ergebnis zeigt, daß sich der Phage D20 in mindestens 2 Genen von T1 unterscheidet. Das für die Lyse von B/1 verantwortliche Gen sei mit *Ha* bezeichnet, das für die Lyse von SF

mit *Ds*. Die durchgeführte Mischinfektion mit T1 und D20 würde damit eine Zweifaktorkreuzung vom Typ *HaDs* × *Ha*<sup>+</sup>*Ds*<sup>+</sup> darstellen, in der *HaDs*<sup>+</sup> und *Ha*<sup>+</sup>*Ds* als Rekombinanten auftreten. Diese Annahme konnte durch eine Kreuzung der Rekombinanten *HaDs*<sup>+</sup> × *Ha*<sup>+</sup>*Ds*, in der die ursprünglichen Parentaltypen *HaDs* und *Ha*<sup>+</sup>*Ds*<sup>+</sup> auftraten, bestätigt werden.

**1. Lokalisation von *Ds*.** Zur Einordnung des Genes *Ds* in die bekannte Karte der Kopplungsgruppe des Phagen T1 wurde zunächst eine 2 Faktor-Kreuzung *Ge* × *Ds* auf B durchgeführt. Rekombinanten *GeDs* und ++ traten in gleicher Menge mit einer Gesamthäufigkeit von 7% auf. Die Einzelwurfanalyse einer 3 Faktor-Kreuzung *GeDs* × *Hr* ergab dann schließlich die in Abb. 1 wiedergegebenen Kopplungsverhältnisse.

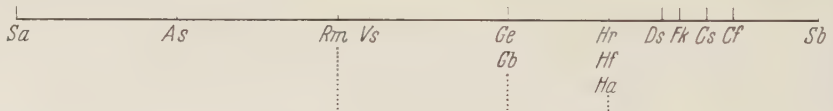


Abb. 1. Genkarte des Bakteriophagen T1 mit relativen Genabständen. Die Gene *Sa*, *As*, *Cs*, *Cf* wurden von COUTINHO (1958) eingeordnet

**Technik.** Zu 0,4 ml einer Kreuzungsmischung mit einem Titer je Parentaltyp von [10<sup>10</sup>] werden 0,1 ml einer frisch gewachsenen Kultur von B [4 · 10<sup>8</sup>] gegeben. Nach einer Adsorptionszeit von 4 min werden infizierte Zellen von nichtadsorbierten Phagen befreit. Solche Zellen werden zur Einzelwurfanalyse mit einer mittleren Zellzahl je Röhrchen von 0,8 in Wassermannröhrchen ausgetropft. Die Röhrchen werden 1 Std bei 37° bebrütet und ihr Inhalt mit einer Bakterienmischung B/1 und SF plattiert. Auf dieser Bakterienmischung werden Phagenlöcher von allen Typen außer +++ und *Ge* ++ hervorgerufen. Zur Bestimmung der Häufigkeit der Rekombinationsklassen, der +++ bzw. *Ge* ++ angehören, werden die Werte des jeweiligen reziproken Rekombinantentyps *GeHrDs* bzw. +*HrDs* verdoppelt.

Tabelle 2 gibt das Resultat zweier Kreuzungen dieses Typs wieder.

**2. Lokalisation von *Ha*.** Da sich der Phage *Ha* außerordentlich schlecht auf B vermehrt — dieses hat z. B. die technische Konsequenz, daß Lysate mit einem Titer von 10<sup>8</sup> nur durch Abschwemmen konfluent lysierter Platten zu gewinnen



sind —, wurden Kreuzungen zur Lokalisation von *Ha* auf SF durchgeführt. Dieses wurde ermöglicht durch eine Markierung beider Parentaltypen mit dem Gen *Ds*. Eine Zweifaktor-Kreuzung *Ge* + *Ds* × + *HaDs* lieferte Rekombinanten *GeHaDs* und ++ *Ds* mit einer Häufigkeit von 5,4 %. Eine parallel durchgeführte 2-Faktor-Kreuzung *Ge* + *Ds* × + *HrDs* ergab den gleichen Wert. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, daß der Genabstand *Ge Ha* dem vom *Ge Hr* entsprach. Eine Kreuzung *HrDs* × *HaDs*, unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die vorher beschriebenen, lieferte unter  $5 \times 10^3$  getesteten Partikeln keine Rekombinanten. Damit ist *Ha* etwa an der gleichen Stelle zu lokalisieren wie *Hr*. Selektionsversuche mit Bakterien haben aber gezeigt, daß *Ha* und *Hr* verschiedene Allele sind: so waren Bakterien, die aus B gegen T1 *Hr* selektioniert wurden (B, 1. *Hr*) in ihrem Resistenzverhalten anders als Bakterien B/*Ha* (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 2							
<i>Ge</i> + <i>Ds</i>	+ <i>Hr</i> +	<i>GeHr</i> +	++ <i>Ds</i>	<i>GeHrDs</i>	+++	<i>Ge</i> ++	+ <i>HrDs</i>
1486	1186	53	71	7	nicht		21
938	527	33	51	3	zählbar		30

Funktionen der Gene *Ds* und *Ha*

1. Bestimmung des Adsorptionsvermögens. Das Gen *Ds* kann in T1-Phagen eingekreuzt werden und verleiht diesen die Fähigkeit, den Stamm SF zu lysieren. Wie Adsorptionsmessungen (Abb. 2) zeigen, beruht der Unterschied zwischen *Ds*-

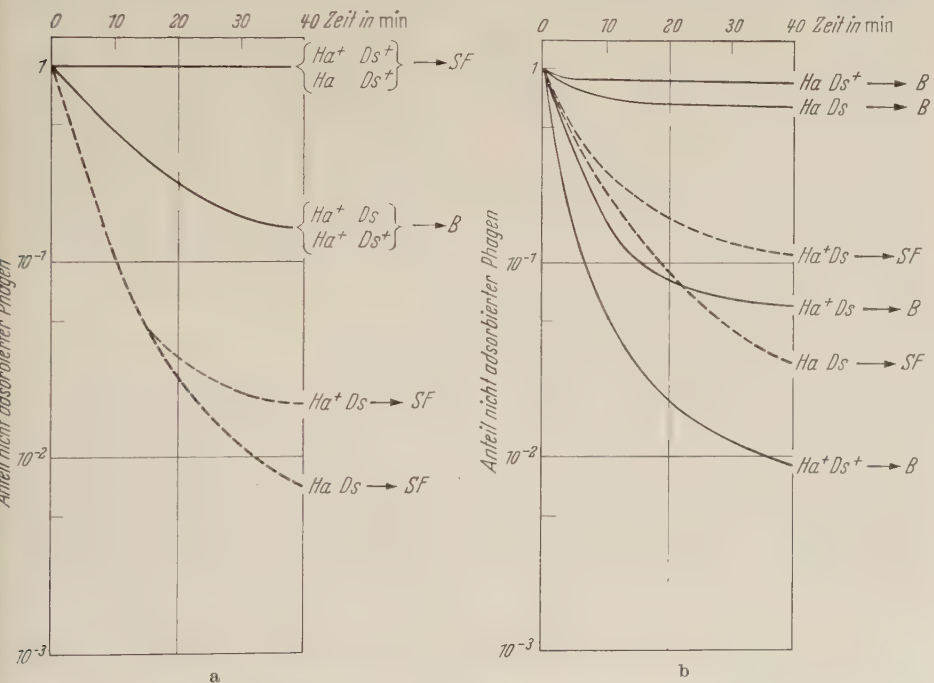


Abb. 2a u. b. Adsorption verschiedener Phagentypen an Bakterien B (—) oder SF (---). a in Bouillon + 6 g NaCl/Liter, b in Medium nach WATSON. Kurven gewonnen aus 3 Messungen. Technik: Phagen wurden mit einem Infektionstiter von 0,1 an Bakterien ( $10^8$  in Adsorptionsmedium + 2,5 mg Chloramphenicol je Liter) bei 30° C adsorbiert. Die Adsorptionsmischung wurde zu verschiedenen Zeiten verdünnt und zentrifugiert, die nichtadsorbierten Phagen aus dem Zentrifugationsüberstand titriert

und  $Ds^+$ -Phagen auf der Fähigkeit von  $Ds$ -Phagen, mit großer Wirksamkeit an SF zu adsorbieren, wozu  $Ds^+$ -Phagen nicht in der Lage sind.

Die Einführung des Gens  $Ha$  in ein T1-Genom befähigt solche Phagen zur Lyse des Bakteriums B/1, jedoch ist — wie bereits von ADAMS für  $Ha Ds$  (= D20) beschrieben — dabei die Adsorptionsfähigkeit an B/1 und auch an B verglichen zu anderen in Abb. 2 dargestellten Adsorptionsraten sehr schlecht. Beide Konsequenzen des Gens  $Ha$  — Fähigkeit zur Lyse von B/1 und schlechte Adsorption an

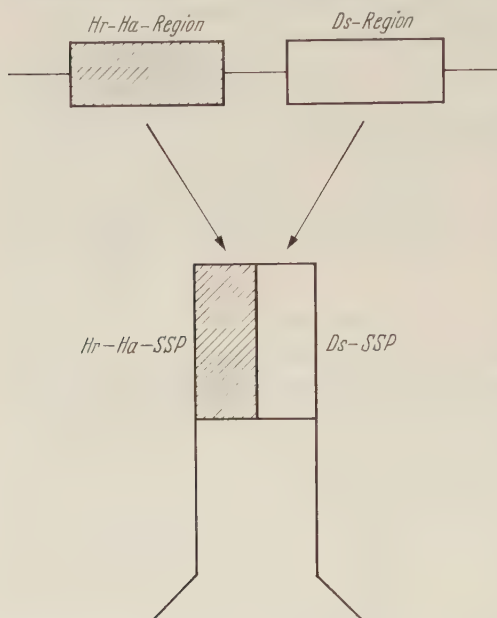


Abb. 3. Schematische Darstellung der angenommenen Beziehungen zwischen den Genen  $Ha$  und  $Ds$  und den  $Ha$ - bzw.  $Ds$ -Proteinen

Die Adsorption an B würde durch das in der  $Hr$ -Region vorliegende Allel ( $Hr$ ,  $Ha$ ,  $Hr^+ = Ha^+$ ) bestimmt (Abb. 3).

Ein experimenteller Anhaltspunkt für die Behauptung, daß die Adsorption an B nur durch das von  $Ha$  determinierte Protein kontrolliert wird, ergibt sich aus Selektionsversuchen: So sind Bakterien  $B/Ha^+ Ds = B/Ha^+ Ds^+ (= B/1)$  und  $B/Ha Ds (= „B/D20“) = B/Ha Ds^+$ .

**2. Kein Einfluß der Gene  $Ha$  und  $Ds$  auf intrazelluläre Vermehrung.** Als nächstes sollte festgestellt werden, ob auch die intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit eines Phagen von der Gegenwart der hier diskutierten Gene beeinflusst wird.

Zur Entscheidung der Frage, ob das Allel  $Ds$  auch für die Vermehrung in SF erforderlich ist, mußte ein  $Ds^-$ -Phage in eine SF-Zelle gebracht werden. Diese Situation konnte unter Ausnutzung des Phänomens des „Phenotypic mixing“ erreicht werden.

Phenotypic mixing wurde zuerst von NOVICK und SZILLARD (1951) für T2 und T4 beschrieben — später auch für T2 und T2  $h$  (STREISINGER und FRANKLIN 1956),  $\lambda$  und  $\lambda h$  (JACOB et al., 1957) T1 und T1  $Hr$  (TRAUTNER, 1957) gefunden.

B und B/1 — waren durch Kreuzungsexperimente nicht zu trennen.

Aus den Adsorptionsmessungen ergibt sich damit der Schluß, daß die Gene  $Ds$  und  $Ha$  das Adsorptionsvermögen kontrollieren.

Diese Funktion der Gene läßt sich weiter spezifizieren: Ein Phage adsorbiert mit der Spitze seines Schwanzes an die Bakterienzelle. Die Spezifität dieser Adsorption wird determiniert durch die Struktur eines oder mehrerer Proteine, die im Phagenschwanz lokalisiert sind. Diese Spezifität ist mutativen Einflüssen unterworfen.

In diesem Sinne kann die Funktion der Gene  $Ds$  und  $Ha$  als Kontrolle der Bildung eines spezifischen Schwanzspitzenproteins (SSP) aufgefaßt werden. Für die Adsorption an SF wäre demnach das durch  $Ds$  determinierte SSP verantwortlich.



Wird eine Bakterienzelle von 2 Phagen infiziert, die sich in ihrer Adsorptionsfähigkeit an verschiedene Bakterien unterscheiden, so finden sich in der Nachkommenschaft Partikel, die genotypisch einem infizierenden Typ gleichen, in ihrem Adsorptionsverhalten jedoch dem anderen entsprechen. Nach NOVICK und SZILLARD und nach quantitativen Untersuchungen von STREISINGER (1956) und BRENNER (1957) kommen die phänotypisch gemischten Typen dadurch zustande, daß die Schwanzspitzenproteine beim Zusammenbau der Phagen offenbar statistisch und nicht spezifisch auf die vorhandenen Genotypen verteilt werden.

Durch Mischinfektion von B mit *Ds* und *Ds*<sup>+</sup> wurden Phagen erhalten, die genotypisch *Ds*<sup>+</sup> waren, aber die Adsorptionsfähigkeit von *Ds* besaßen. Solche Phagen konnten SF infizieren und zeigten die gleiche Vermehrungsfähigkeit wie *Ds*. Die Unfähigkeit von *Ds*<sup>+</sup> zur Vermehrung auf SF ist damit ein reines Adsorptionsphänomen.

Für *Ha* markierte Phagen konnte ein analoges Ergebnis erzielt werden: ist ein solcher Phage einmal an ein sensibles Bakterium adsorbiert, so wird seine intrazelluläre Vermehrung durch die Gegenwart des Genes *Ha* nicht beeinträchtigt.

Dieses Ergebnis wurde dadurch gewonnen, daß Phagen *HaDs* und *Ha*<sup>+</sup>*Ds* an B adsorbiert wurden. Die Wurfgrößen von *HaDs*- und *Ha*<sup>+</sup>*Ds*-infizierten Zellen wurden in Einzelwurfanalyse (Plattierung auf SF) miteinander verglichen.

**3. Gegenseitige Beeinflussbarkeit der *Ha*- und *Ds*-Funktionen.** Die Adsorptionsfähigkeit überhaupt wird durch *Ha*- bzw. *Ds*-determinierte SSP bestimmt. Wenn die beiden Typen von SSP unabhängig voneinander operierten, müßten alle Adsorptionen an SF ausschließlich der durch das *Ds*-Protein bestimmten Kinetik folgen. Die wiedergegebenen Kurven zeigen jedoch, daß die Kinetik der Adsorption an SF durch das *Ha*-kontrollierte SSP zu beeinflussen ist. Ein analoger Einfluß des *Ds*-Proteins zeigt sich bei der Adsorption von *Ha* an B. Außerdem ist die Adsorption von dem gegebenen Ionenmilieu abhängig. Beide Adsorptionsfunktionen sind also durchaus durch die Gegenwart von SSP, die an der jeweiligen Adsorption *nicht* beteiligt sind, zu beeinflussen. Dieser Befund läßt darauf schließen, daß die *Ha*- und *Ds*-Spezifitäten eng miteinander assoziiert sind.

### Serologische Untersuchungen

Die neutralisierende Wirkung von Antiphagen Serum beruht auf einer Verbindung von Antikörpermolekülen mit Eiweißstrukturen der Schwanzspitze. Wie gezeigt wurde, wird der Wirtsbereich eines Phagen ebenfalls durch Strukturen der Schwanzspitze determiniert. Sowohl die Antigen-Antikörper-Verbindung als auch die Adsorption stellen hochspezifische Reaktionen des Phagen dar. In der Hoffnung, Parallelen zwischen dem serologischen und Adsorptionsverhalten der hier benutzten Phagen aufzufinden, wurden Neutralisationsversuche durchgeführt.

*Technik.* Anti-„D20“-Serum wurde 1:1000 mit M9 verdünnt. Verschiedene Phagen *Ha*<sup>+</sup>*Ds*<sup>+</sup>, *HaDs*<sup>+</sup>, *Ha*<sup>+</sup>*Ds*, *HaDs*, *HrDs* wurden zu einem Endtiter von 10<sup>7</sup> in dieses Serum verdünnt. Die Seruminaktivierung fand bei 37° C statt. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben aus der Inaktivierungsmischung 1:100 in Bouillon verdünnt und ausplattiert.

Die Ergebnisse von 3 Neutralisationsversuchen der Phagen *Ha*<sup>+</sup>*Ds*<sup>+</sup>, *HaDs*<sup>+</sup>, *Ha*<sup>+</sup>*Ds*, *HrDs*, *HaDs* sind in Abb. 4 zusammengefaßt. Aus den bisher gewonnenen

Vorstellungen über die Struktur der Schwanzspitze entwickeln sich die folgenden Fragen zum Neutralisationsverhalten der Phagen:

1. Werden die Aktivitäten eines Phagen gegen SF und B gleichzeitig durch das Antiserum inaktiviert? Hierzu müssen Neutralisationskurven von *Ds*-Phagen nach Plattierung auf SF und B verglichen werden. Wie aus der Abb. 4 zu entnehmen ist, wird die Aktivität der resp. Phagen gegen SF erheblich stärker

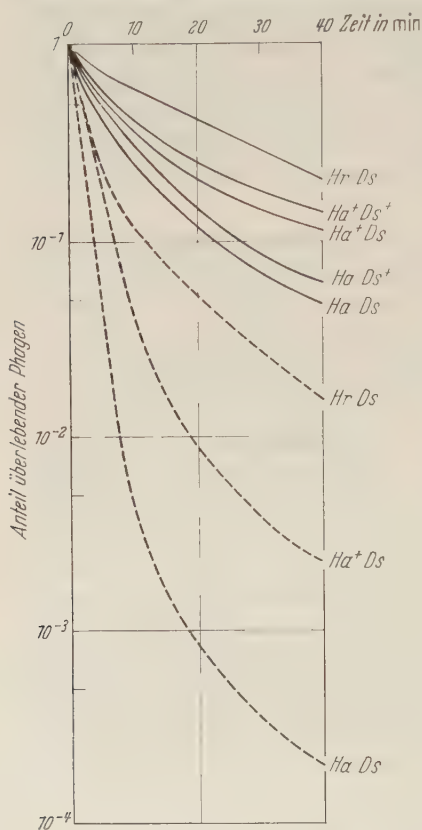


Abb. 4. Serumaktivierungen verschiedener Phagen bei Plattierung mit Bakterien B (—) und SF (---). Zusammenfassung von 3 Versuchen

inaktiviert als gegen B. Ein ähnlicher Befund ist von KALMANSON und BRONFENBRENNER (1942) für T2 bei Plattierung auf *B. dysenteriae* Shiga und auf *E. coli* und von FRIEDMANN (1954) für den *Megatherium*-Phagen M-5 beschrieben worden. Dieses Ergebnis bestärkt die Vorstellung einer Doppelspezifität der *Ds*-Phagen.

2. Hat das Antiserum auch Aktivität gegen den nichthomologen Phagen *Ha<sup>+</sup>Ds<sup>+</sup>*? Ein Vergleich der aus Plattierungen auf B gewonnenen Kurven bestätigt den von ADAMS bereits beschriebenen Befund, daß Anti-*HaDs*-Serum mit *Ha<sup>+</sup>Ds<sup>+</sup>* kreuzweise reagiert. Weiterhin zeigt sich, daß ein Phage um so stärker mit dem Antiserum reagiert, je mehr antigen-homologes Protein er enthält. So wird innerhalb der auf B plattierten Kurven *Ha<sup>+</sup>Ds<sup>+</sup>* am schwächsten, *HaDs* am stärksten inaktiviert, dazwischen liegen die Inaktivierungskurven der Rekombinanten.

Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß es sich bei den *Ha*- und *Ha<sup>+</sup>*-Proteinen sowie *Ds*- und *Ds<sup>+</sup>*-Proteinen um ähnliche Strukturen handelt.

*Hr*-markierte Phagen reagieren ebenfalls mit dem Antiserum. Ihre Neutralisation ist jedoch schwächer als die für *Hr<sup>+</sup>* beobachtete. Damit liegt hier ein serologisch nachweisbarer Unterschied zwischen dem Wildphagen und seiner *Hr*-Mutante vor.

In diesem Zusammenhang mag darauf hingewiesen werden, daß die Mutationen *T1* → *T1 Hr* und *T1 Hr* → *T1* selbst nach Nitritbehandlung der Phagen äußerst selten (weniger als  $10^{-8}$ ) auftreten. Dieses Ergebnis deutet auf einen erheblichen genetischen Unterschied zwischen *T1* und *T1 Hr* bzw. *Ha* hin, der sich offenbar in einem starken strukturellen Unterschied des SSP widerspiegelt. Bei *T2*, wo Mutationen *h<sup>+</sup>* → *h* mit erheblich größerer Häufigkeit beobachtet werden, konnten keine serologischen Unterschiede zwischen host range und wild-Phagen beobachtet werden (LURIA 1945).

Weiterhin ist bemerkenswert, daß die serologische Verwandtschaftsreihe *Ha*, *Ha<sup>+</sup>* = *Hr<sup>+</sup>*, *Hr* nicht parallelisiert ist durch das Adsorptionsvermögen an B/1.



3. Ist die Neutralisation beeinflussbar durch das für die jeweilige Adsorption nicht verantwortliche SSP? Hierzu sind die Neutralisationskurven *HaDs*, *Ha'Ds*, *HrDs* gegen SF; *HaDs*, *HaDs'* gegen B und *Ha'Ds*, *Ha'Ds'* gegen B zu vergleichen. Wie zu erkennen ist, wird innerhalb dieser 3 Gruppen derjenige Phagentyp am stärksten inaktiviert, der zusätzlich zu seinem zur Adsorption benötigten SSP ein Protein trägt, das im Antigen vorkam. Die Reaktion eines Antikörpers mit dem „Nachbarprotein“ scheint die Adsorption zu hindern. Auch hier zeigt sich wieder die wechselseitige Abhängigkeit der Funktionen von *Ha*- und *Ds*-determinierten Proteinen.

Nach der Besprechung der Neutralisationskurven soll noch kurz die Frage diskutiert werden, um welche Proteinstrukturen im Phagenschwanz es sich möglicherweise bei der hier beschriebenen Neutralisation handelt:

Man weiß aus den Arbeiten verschiedener Autoren (Zusammenfassung bei TOLMACH 1957), daß die Adsorption in 2 Schritten erfolgt: einem reversiblen und einem irreversiblen. Wie Arbeiten an T2 ergaben (BURNET et al. 1937, NAGANO und MUTAI 1954, TOLMACH 1957), wird bei diesem Phagen durch Serumbehandlung nur der 2., d.h. irreversible Adsorptionsschritt, betroffen. TOLMACH (1957) zitiert eigene unveröffentlichte Versuche, wonach diese Situation auch für T1 zutreffen soll. Hierzu wurden keine eigenen Versuche durchgeführt. Akzeptiert man diese Vorstellung, so sind die *Ha*- und *Ds*-determinierten Proteine für den irreversiblen Adsorptionsschritt verantwortlich. Aus den Adsorptionsmessungen konnte andererseits geschlossen werden, daß zumindest das durch *Ds* determinierte Protein auch für das Funktionieren der reversiblen Adsorption an SF vorhanden sein muß. Durch weitere Versuche muß geklärt werden, ob dieser Befund so zu interpretieren ist, daß im Falle von *Ds* reversibler und irreversibler Adsorptionsschritt mit dem serologisch gleichen Protein erfolgen oder ob generell bei T1 bereits der erste Adsorptionsschritt durch die Serumbehandlung gehemmt werden kann.

### Summary

The close relationship between phages T1 and D20 was confirmed by genetical crosses. D20 could be shown to differ from T1 by at least two genes, both affecting the host range of the phage. The gene *Ds* will render a phage capable of multiplying on the original host of „D20“, SF; *Ha* will enable the phage to lyse B/1. D20 may thus be formulated as T1 *HaDs*. Both genes could be localized within the T1 linkage map, in the vicinity of the gene *Hr*, which is known to control the host range specificity against B/1. The results of genetical, adsorption, and serological studies can be interpreted by the assumption that each gene controls the synthesis of a specific protein, responsible for the adsorption behaviour of the particular phage. A phage will adsorb to SF according to its *Ds* genotype, to B or its phage resistant mutants according to its *Ha* genotype. These proteins do not, however, exert their functions independently. The rates of adsorption and neutralization are influenced by the presence or absence of proteins not required for the particular reaction under investigation.

Dr. ELINOR MEYNELL danke ich für die großzügige Überlassung des Anti-D20-Serums, Prof. Dr. BRESCH für kritische Diskussion. Fräulein H. MODERSOHN bin ich für gewissenhafte Assistenz bei der Durchführung der Versuche dankbar. Diese Arbeit wurde durch eine Sachbeihilfe der „Deutschen Forschungsgemeinschaft“ unterstützt.

## Literatur

- ADAMS, M. H., and E. WADE: Classification of bacterial viruses: Characteristics of the T1, D20 Species of Coli-dysentery phages. *J. Bact.* **70**, 253 (1955).
- BENZER, S.: Resistance to ultraviolet light as an index to the reproduction of bacteriophage. *J. Bact.* **63**, 59 (1952).
- BRENNER, S.: Genetic control and phenotypic mixing of the adsorption cofactor requirement in bacteriophages T2 and T4. *Virology* **3**, 560 (1957).
- BRESCH, C., u. H. D. MENNIGMANN: Weitere Untersuchungen zur Genetik von T1-Bakteriophagen. *Z. Naturforsch.* **9b**, 212 (1954).
- BRESCH, C., u. T. TRAUTNER: Die Bedeutung des Zweifarb-Nährbodens für genetische Untersuchungen am Bakteriophagen T1. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **87**, 590 (1955).
- BURNET, F. M.: The classification of dysentery-coli phages. III. Correlation of serological classification with certain biochemical tests. *J. Path. Bact.* **37**, 179 (1933).
- BURNET, F. M., E. V. KEOGH and D. SUSH: The immunological reactions of the filtrable viruses. *Aust.-J. exp. Biol. med. Sci.* **15**, 227 (1937).
- COUTINHO, M.: Unveröffentlichte Ergebnisse 1958.
- FRIEDMAN, M.: The effect of the host on the properties and sensitivity of a bacterial virus. *J. Bact.* **68**, 274 (1954).
- JACOB, F., C. R. FUERST and E. L. WOLLMAN: Recherches sur les bactéries lysogènes défectives. II. Les types physiologiques liés aux mutations du prophage *Ann. Inst. Pasteur* **93**, 724 (1957).
- KALMANSON, G., and I. BRONFENBRENNER: Evidence of serological heterogeneity of polyvalent "pure live" bacteriophage. *J. Immunol.* **45**, 13 (1942).
- LURIA, S. E.: Mutation of bacterial viruses affecting their host range. *Genetics* **30**, 84 (1945).
- MENNIGMANN, H. D.: Zur Genetik des Bakteriophagen T1. Diss. Göttingen 1955.
- NAGANO, Y., et M. MUTAI: Etudes sérologiques sur le bactériophage. Adsorption du bactériophage neutralisé sur la bactérie hôte. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **148**, 766 (1954).
- NOVICK, A., and L. SZILLARD: Virus strains of identical phenotype but different genotype. *Science* **113**, 34 (1951).
- STREISINGER, G.: Phenotypic mixing of host range and serological specificities in bacteriophages T2 and T4. *Virology* **2**, 388 (1956).
- STREISINGER, G., and N. C. FRANKLIN: Mutation and recombination at the host range genetic region of phage T2. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **21**, 103 (1956).
- TOLMACH, L. J.: Attachment and penetration of cells by viruses. *Advanc. Virus Res.* **4**, 63 (1957).
- TRAUTNER, T.: Unveröffentlichte Ergebnisse 1957.

THOMAS A. TRAUTNER,  
Botanisches Institut der Universität Abt. für Mikrobiologie,  
Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 15



Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

ZUM PROBLEM DER WIRKUNG VON VERFÜTTERTEM EISEN-  
SACCHARAT AUF DIE DURCH RÖNTGENSTRAHLEN INDUZIERT  
MUTATIONSRATE BEI *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Von

H. TRAUT

(Eingegangen am 15. August 1960)

Einleitung

Mehrere Autoren berichteten über eine Erhöhung der strahleninduzierten Mutationsrate durch Inkorporation von Metallsalzen: Bei der Gerste nach Tränken der Samen mit Lösungen bestimmter Salze von Barium, Eisen, Blei und Uran (STADLER 1928, D'AMATO und GUSTAFSSON 1948) und bei *Drosophila* durch Verfüttern von Bleiazetat (MEDVEDEV 1933, BUCHMANN und ZIMMER 1941), Uranylazetat (BUCHMANN und SYDOW 1940), Arsentrioxyd (SCHÜTZE 1943) und Eisensaccharat (BUCHMANN und HOTH 1937, BUCHMANN und ZIMMER 1940, RAPOPORT 1943). Da diese Arbeiten bereits mehrmals, zum Teil eingehend, referiert worden sind (SCHÜTZE 1943, TIMOFÉEFF-RESSOVSKY und ZIMMER 1947, BAUER 1948, CATCHESIDE 1948, MULLER 1954), soll der „Metalleffekt“ hier nur soweit besprochen werden, als es die folgenden Untersuchungen an *Drosophila* nötig erscheinen lassen. Während nach BUCHMANN und ZIMMER (1941) sowie SCHÜTZE (1943) die bei *Drosophila* festgestellte Wirkung der Verfütterung von Blei- und Arsensalzen auf erhöhte Strahlenabsorption zurückgeht („physikalische Erklärung“), versagte die Deutung der Ergebnisse durch diesen vom theoretischen Standpunkt trivialen Effekt im Falle des Eisens: Hier zeigte die Erhöhung der Mutationsrate keine Abhängigkeit von der Wellenlänge der benutzten Strahlung, wohl aber bei Blei und Arsen, für die sie in der gleichen Weise von der Wellenlänge abhängig gefunden wurde, wie der Massenabsorptionskoeffizient des verfütterten Metalls. Daher vermuteten BUCHMANN und ZIMMER (1941) irgendeine physiologische Wirkungsweise des Eisens. RAPOPORT (1943) spezifizierte diese Vorstellung anhand eigener Untersuchungen, indem er eine Intensivierung der mutagenen Wirkung strahleninduzierter Verbindungen (vorwiegend vom Typ der Ozonide) durch Eisen annahm. In diesem Zusammenhang wiesen STONE et al. (1954) auf die in vitro Befunde von SCHOLES und WEISS (1952) hin, denen zufolge  $H_2O_2$  allein Nukleinsäuren nicht angreift, wohl aber bei Gegenwart von  $Fe^{++}$  durch Bildung von OH-Radikalen (Fentons Reagenz). Neuerdings führt ABRAHAMSON (1959) den bei *Drosophila* berichteten Eiseneffekt als Hauptargument für die Auslösung von Mutationen auf indirektem Wege an.

Obwohl uns diese Vorstellungen (Wirkungen über Ozonide bzw. Fentons Reagenz) wenig überzeugend erschienen (z. B. weil es zweifelhaft ist, ob das Eisen nicht größtenteils als  $Fe^{+++}$  in der Zelle vorliegt), hielten wir weitere Untersuchungen für gerechtfertigt, da neuere Arbeiten auch auf ganz andere Denkmöglich-

keiten hinweisen (PORTER und WRIGHT 1959): Durch Eisenionen ermöglichten Übergang von Singulett — in langlebige Triplettzustände und dadurch verursachte Intensivierung der Strahlenwirkung (s. ZIMMER 1960). Wegen der so eröffneten interessanten Perspektiven erschien es uns wichtig, zunächst ein größeres Material zu sammeln mit der Absicht, die früheren Ergebnisse zu reproduzieren und weitere Parameter in die Betrachtung einzubeziehen.

Tabelle 1. Zusammenstellung der bisher über den Eiseneffekt (*Drosophila*) erschienenen Arbeiten  
Stets CIB-Technik, sichtbare Mutationen des X-Chromosoms einbezogen (ausgenommen bei RAPOPORT)

Versuch	Autor	Dosis	Mutationsrate		Statistische Prüfung der Unterschiede ( <i>P</i> )
			ohne Fe	mit Fe	
(1)	BUCHMANN u. HOTH 1937	3000 r, 100 kV	8,63 % (56/649)	12,40 % (160/1290)	0,015
(2a)	BUCHMANN u. ZIMMER 1940	3000 r, 180 kV	9,94 % (80/805)	12,95 % (357/2756)	0,022
(2b)	BUCHMANN u. ZIMMER 1940	3000 r, 50 kV	9,52 % (251/2640)	13,50 % (614/4539)	
(3)	RAPOPORT 1943	4000 r	8,2 % (87/1068)	9,8 % (123/1251)	0,16

Zur statistischen Prüfung (Tabelle 1) der in den früheren Arbeiten gefundenen Unterschiede ( $\chi^2$ -Methode) sei bemerkt, daß die bei (2a) berechnete Differenz nur dann signifikant ( $P < 0,01$ ) wird, wenn man das dem Kontrollwert von (2a) zugrunde liegende Material durch Hinzunahme des Kontrollmaterials von (2b) vergrößert. Dies ist wegen der Wellenlängenunabhängigkeit der Letalenrate in diesem Spektralbereich (TIMOFÉEFF-RESSOVSKY und ZIMMER 1935) erlaubt. Bei (2b) wurde wegen der Heterogenität des dem Eisenwert zugrunde liegenden Materials auf die Ermittlung von *P* verzichtet.

Erwähnt sei noch, daß die bisherigen Versuche, an die Fliegen verfüttertes Eisen in den Gonaden nachzuweisen, negativ verlaufen sind (BUCHMANN und HOTH 1937, BORN und ZIMMER 1940); vielleicht ergäben modernere Methoden (z.B. die der Radioautographie oder der Neutronenaktivierung) ein anderes Resultat.

### Methodik

Wie bei BUCHMANN et al. wurden die Fliegen (Berlin wild bzw. *Bar* ♂♂) im Alter von einem Tag isoliert, 4 Tage lang (ohne  $\frac{1}{2}$   $\frac{1}{2}$ ) auf dem Eisenfutter gehalten und dann im Alter von 5 Tagen in perforierten Gelatine kapseln bestrahlt. Entsprechend verfahren wir mit den Kontroll-♂♂ (Näheres s. Diskussion). Ebenso wie bei BUCHMANN et al. beschrieben, stellten wir das Eisenfutter durch Einrühren flüssigen Eisenzuckers (*Ferrum oxydatum cum Saccharo liquidum*<sup>1</sup> 2,8—3,0 % Eisen enthaltend) in das noch heiße, dünnflüssige Futter her, das in der üblichen Weise aus Maismehl, Sirup, Agar-Agar und Hefe bereitet war: 10 cm<sup>3</sup> Eisenzucker auf 100 cm<sup>3</sup> Futter. In einem Fall (s. Versuch 3, Tabelle 2) ersetzten wir den Eisenzucker durch Eisen-II-glukonat, das wir als 10 %ige Lösung im Verhältnis 1:10 dem Medium beimengten.

Die meisten Bestrahlungen führten wir mit 150 kV durch; denn trotz der früher mitgeteilten Wellenlängenunabhängigkeit der durch das Eisen bewirkten Mutationsraten-erhöhung (Bestrahlung bei 50 und bei 180 kV) und der daraus gefolgerten Ablehnung der „physikali-

<sup>1</sup> Genaue Formel bei BERSIN (1951).



Tabelle 2. Zusammenstellung der Bestrahlungs- und Kreuzungsbedingungen unserer Versuche

Ver- such	Untersuchter Mutationstyp und verwendeter Stamm <sup>1</sup>	Kreuzungsbedingungen	Bestrahlungsbedingungen
(1)	Rez. geschl. geb. Letalfaktoren und 2/3-Translokationen; <i>y sc</i> <sup>51</sup> <i>In49 sc</i> <sup>8</sup> ; <i>bw; st</i> ♀ × <i>B</i> ♂	Brutmuster (Tage): 1—2—2—3—3, GVP = 3 ♀♀:1 ♂	3000 r, ~20 r/min, 150 kV, 10 mA, HWS = 1,4 mm Cu
(2)	Rez. geschl. geb. Letalfaktoren; Stamm wie bei (1)	Brutmuster (Tage): 1—2—6, GVP = 3 ♀♀:1 ♂	3040 r, ~600 r/min, 50 kV, 10 mA, HWS = 0,09 mm Al
(3)	Translokationen; <i>y; cn; ss</i> ♀ × <i>B. wild</i> ♂	Brutmuster (Tage): 1—2—3, GVP = 3 ♀♀:1 ♂	4000 r, ~500 r/min 150 kV, 20 mA, HWS = 6 mm Al
(4)	Rez. geschl. geb. Letalfaktoren; <i>ClB</i> ♀ × <i>B. wild</i> ♂	Eltern nach 4 Tagen entfernt, GVP = 1 ♀:1 ♂	wie bei (1)

<sup>1</sup> Erklärung der Gensymbole: *y* = yellow (gelbe Körperfarbe); *sc* = scute (Verringerung der Zahl bestimmter Borsten); *bw* = brown (braune Augen); *st* = scarlet (leuchtend hellrote Augen); *B* = Bar (schlitzförmige Augen); *cn* = cinnabar (hellrote Augen); *ss* = spineless (Borstengröße reduziert). *y, sc, Bar* auf X-Chromosom, *bw, cn* auf 2. Chromosom, *st, ss* auf 3. Chromosom.

schen“ Erklärung, erschien es uns sicherer, durch die vorwiegende Verwendung harter Röntgenstrahlen (150 kV entsprechend) die Beteiligung einer Strahlenabsorptionserhöhung beim Wirkungsmechanismus des Eisens unwahrscheinlicher zu machen als diese bei der Verwendung weicher Strahlen (50 kV entsprechend) wäre. Eine auf Erhöhung der Röntgenstrahlenabsorption beruhende Funktion des Eisens ist, wie bereits erwähnt, im Vergleich zu den oben erörterten Vorstellungen trivial und kaum der näheren Untersuchung wert.

Ein Teil unserer Versuche berücksichtigt die Abhängigkeit der Mutationsrate vom Reifegrad der bestrahlten Keimzellen (Brutmustertechnik). Das Zahlenverhältnis  $P \frac{♀}{♂} : P \frac{♂}{♂}$  ist in Tabelle 2 durch GVP abgekürzt. Wir wählten meistens ein GVP = 3, um den Verbrauch der in den aufeinander folgenden Bruten jeweils reifen Spermien einigermaßen zu gewährleisten (vgl. TRAUT 1960). — Die Zuchttemperatur betrug  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ .

Einzelheiten der Bestrahlungs- und Kreuzungsanordnung sind aus Tabelle 2 ersichtlich. Die hier aufgezählten Versuche setzen sich meist aus mehreren kleineren Versuchen zusammen, deren Ergebnisse untereinander homogen sind. Der bei (1) und (2) verwendete „Zweizweckstamm“ erlaubt die Erfassung von Translokationen und rezessiv geschlechtsgebundenen Letalfaktoren aus den Nachkommen der gleichen bestrahlten ♂♂<sup>1</sup>. Wegen Einzelheiten dieser Kreuzungstechnik sei auf OSTER (1958) verwiesen. Wir registrierten hier nur Translokationen zwischen dem 2. und 3. Chromosom; auf die Erfassung von Translokationen mit dem Y-Chromosom wurde verzichtet aus Gründen, die MULLER (1954) angibt. In Versuch (3) dienten als markers des 2. bzw. 3. Chromosoms *cn* und *ss*. Zur Erfassung von Translokationen mit dem X-Chromosom verwendeten wir  $P \frac{♀}{♂}$  mit XX. Bei (4) benutzten wir die ClB-Technik anstelle von M-5 mit dem Ziel der möglichst genauen Reproduzierung der Buchmannschen Kreuzungsanordnung. Die Versuche (1) und (4) stimmen in den Bestrahlungsbedingungen völlig mit denen von BUCHMANN und ZIMMER (1940) überein, Versuch (4) außerdem in der Kreuzungsanordnung. Dies war uns dank persönlicher Mitteilungen von BUCHMANN (genetischer Teil) und ZIMMER (physikalischer Teil) möglich. Allerdings sahen wir im Gegensatz zu BUCHMANN et al. von der Registrierung geschlechtsgebundener sichtbarer Mutationen ab, da uns deren Häufigkeit für Untersuchungen dieser Art zu gering und außerdem mit einem erheblichen subjektiven Fehler verbunden zu sein scheint.

<sup>1</sup> Dieser von Herrn Dr. I. OSTER (Philadelphia) konstruierte Stamm wurde uns von Frau Dr. CH. AUERBACH (Edinburgh) überlassen; beiden sei hier bestens gedankt.

Ergebnisse

Wir begannen unsere Experimente zur Reproduzierung des Eiseneffekts mit einem Versuch<sup>1</sup>, der neben Letalfaktoren auch Translokationen, sowie die Reifegradabhängigkeit berücksichtigt (Versuch 1, Tabelle 2). Tabelle 3 gibt die Er-

Tabelle 3. (Versuch 1) Vergleich der mit 3000 r, 150 kV bei Verwendung eines Zweizweckstammes erhaltenen Raten von 2/3-Translokationen und rezessiv geschlechtsgebundenen Letalfaktoren aus eisengefütterten und -ungefütterten *Drosophila melanogaster*-♂♂

Brutmuster	Translokationen		Letalfaktoren		Statistische Prüfung der Unterschiede (P)	
	ohne Fe	mit Fe	ohne Fe	mit Fe	Translokationen	Letale
1. Tag	7,9% (31/392)	8,9% (76/851)	7,7% (38/495)	6,9% (78/1136)	0,72	0,55
2.—3. Tag	2,3% (11/483)	3,4% (30/890)	5,4% (38/703)	4,5% (60/1338)	0,26	0,36
4.—5. Tag	8,2% (23/279)	6,8% (32/468)	8,4% (37/441)	7,4% (64/863)	0,46	0,54
6.—8. Tag	— (0/6)	— (4/29)	— (3/9)	16% (8/50)	—	—
9.—11. Tag	2,9% (9/310)	0,0% (0/677)	4,3% (18/423)	2,0% (18/909)	<0,001	0,017

gebnisse wieder. In keinem der möglichen Vergleiche ergibt sich ein Hinweis für eine Erhöhung der Mutationsrate durch Eisenfütterung. Die am 9.—11. Tag er-

Tabelle 4. (Versuch 2) Vergleich der mit 3040 r, 50 kV erhaltenen Raten rezessiv geschlechtsgebundener Letalfaktoren aus eisengefütterten und -ungefütterten *Drosophila melanogaster*-♂♂

Brutmuster	Letalfaktoren		Statistische Prüfung der Unterschiede (P)
	ohne Fe	mit Fe	
1. Tag	6,2% (33/532)	7,5% (80/1063)	0,34
2.—3. Tag	4,4% (20/459)	5,3% (56/1049)	0,42
4.—9. Tag	8,4% (50/593)	7,3% (93/1269)	0,40

mittelten Heterogenitäten ( $P < 0,001$  bzw. = 0,017) dürften bei Translokationen auf Übertragung von Spermien aus der vorhergehenden Brut verursacht sein, da nach unseren Erfahrungen (unveröffentlicht), die von MOSSIGE bestätigt werden (persönliche Mitteilung), auch bei hohen

Dosen grundsätzlich ab 8. Tag keine Translokationen mehr nachweisbar sind. Für Letalfaktoren käme neben dieser Möglichkeit noch cluster-Bildung in Frage.

Auch in einem mit weichen

Tabelle 5. Zusammenfassung bzw. Gegenüberstellung der Letalenraten von Tabelle 3 und 4 für die ersten beiden Bruten

Brutmuster	Letalenrate	
	ohne Fe (50 kV + 150 kV)	mit Fe (50 kV + 150 kV)
1. Tag	6,9% (71/1027)	7,2% (158/2199)
2.—3. Tag	5,0% (58/1162)	4,9% (116/2387)

Röntgenstrahlen durchgeführten Versuch (Versuch 2, Tabelle 2) konnten wir den Eiseneffekt nicht bestätigen (Tabelle 4). Die — ungesicherten — Erhöhungen der Eisenraten der ersten und zweiten Brut werden ausgeglichen, wenn man, zur Erzielung eines größeren

Materials, die entsprechenden Werte aus Tabelle 3 hinzunimmt (Tabelle 5). Dies ist erlaubt, weil beide Versuche (1 und 2) sich nur in der Wellenlänge der verwendeten Strahlung unterscheiden (die 150 bzw. 50 kV entspricht). Sowohl für die Kontroll- wie die Eisenrate

<sup>1</sup> Die zugehörigen Kontrollwerte dieses Versuches sind bereits an anderer Stelle (TRAUT 1960) unter einem anderen Gesichtspunkt veröffentlicht.

besteht aber in diesem Spektralbereich Wellenlängenunabhängigkeit (TIMOFÉEFF-RESSOVSKY und ZIMMER 1935 bzw. BUCHMANN und ZIMMER 1940, 1941). Wie Tabelle 5 zeigt, ist bei dem jetzt zugrunde liegenden größeren Zahlenmaterial die Übereinstimmung zwischen Kontroll- und Eisenwert so gut, daß sich deren statistische Prüfung erübrigt.

In Tabelle 6 ist noch einmal der Einfluß der Eisenverfütterung auf die Translokationsrate untersucht (Versuch 3, Tabelle 2), und zwar wurde das Eisen nicht nur als Saccharat sondern auch als Glukonat verfüttert. Auch hier findet sich

Tabelle 6. (Versuch 3) Die bei 4000 r, 150 kV erhaltenen 2/3- und Gesamt- (2/3 + X/2 + X/3 + X/2/3) Translokationen aus eisengefütterten und -ungefütterten *Drosophila melanogaster*-♂♂

Brutmuster	2/3-Translokationen			Gesamttranslokationen		
	ohne Fe	Fe-Saccharat	Fe-Glukonat	ohne Fe	Fe-Saccharat	Fe-Glukonat
1. Tag	10,1% (79/784)	9,1% (66/727)	9,1% (57/629)	12,2% (96/784)	11,3% (82/727)	11,8% (74/629)
2.—4. Tag	5,9% (100/1683)	—	5,8% (49/842)	7,2% (121/1683)	—	7,5% (63/842)
5.—8. Tag	15,5% (18/116)	—	— (0/6)	18,1% (21/116)	—	— (0/6)

kein Hinweis auf die Existenz einer die strahleninduzierte Mutationsrate erhöhen- den Wirkung des Eisens. (Die statistische Prüfung der Unterschiede ist hier wie beim folgenden Versuch überflüssig.)

Obleich aus den bisherigen Ergebnissen bereits deutlich hervorgeht, daß wir die Befunde der früheren Arbeiten nicht reproduzieren konnten, führten wir noch einen Versuch mit der seinerzeit verwendeten ClB-Technik durch, wobei wir auch die sonstigen Kreuzungsbedingungen, sowie die Bestrahlungsanordnung so- weit als möglich denen von BUCHMANN et al. anghichen (Ver- such 4, Tabelle 2; wegen der Kontroll-♂♂ s. Diskussion). Wie jedoch aus Tabelle 7 ersichtlich, sprechen auch unsere ClB-Daten nicht zugunsten eines Eisen- effekts. Ein Vergleich mit Tabelle 1 zeigt, daß unsere Letalenraten deutlich niedriger sind als die von BUCHMANN et al. ermittelten, und zwar sicherlich auch dann noch, wenn man bei den Buchmannschen Raten die Zahlen der sichtbaren geschlechtsgebundenen Mutationen subtrahieren würde (die bei BUCHMANN nicht angegeben sind). Es ist unklar, worauf dieser Unterschied beruht. Hingegen stimmen unsere Werte gut mit neueren Daten anderer Autoren überein, z. B. mit IVES (1959), dessen Versuchsbedingungen<sup>1</sup> den unseren besonders nahe kommen.

Tabelle 7. (Versuch 4) Vergleich der mit 3000 r, 150 kV mittels ClB-Technik erhaltenen Raten von Letalfaktoren aus eisengefütterten und -ungefütterten *Drosophila melanogaster*-♂♂.

Die Versuchsbedingungen von BUCHMANN et al. wurden möglichst genau reproduziert.

ohne Fe	mit Fe	Zum Vergleich: IVES (1959)	
		ohne „Semiletale“	mit „Semiletalen“
6,4% (210/3272)	6,1% (73/1195)	6,1% (128/2094)	6,8% (142/2094)

effekts. Ein Vergleich mit Tabelle 1 zeigt, daß unsere Letalenraten deutlich niedriger sind als die von BUCHMANN et al. ermittelten, und zwar sicherlich auch dann noch, wenn man bei den Buchmannschen Raten die Zahlen der sichtbaren geschlechtsgebundenen Mutationen subtrahieren würde (die bei BUCHMANN nicht angegeben sind). Es ist unklar, worauf dieser Unterschied beruht. Hingegen stimmen unsere Werte gut mit neueren Daten anderer Autoren überein, z. B. mit IVES (1959), dessen Versuchsbedingungen<sup>1</sup> den unseren besonders nahe kommen.

<sup>1</sup> 3000 r, γ-Strahlen. Diese unterscheiden sich in ihrer Wirksamkeit nicht von den hier verwendeten Röntgenstrahlen (TIMOFÉEFF-RESSOVSKY und ZIMMER 1939). P ♂♂ 2 Tage lang ohne ♀♀ gehalten, nach 3 Tagen von den P ♀♀ entfernt.



### Diskussion

Unsere Untersuchungen konnten trotz der Verarbeitung eines großen Zahlenmaterials, der Hinzunahme weiterer Parameter (Translokationen, Reifegrad, Verfütterung von Eisen-II-glukonat) und der zum Teil bis ins Detail der Bestrahlungs- und Kreuzungsanordnung gehenden Übereinstimmung mit den Versuchsbedingungen von BUCHMANN et al. den Eiseneffekt nicht reproduzieren. Demnach erscheinen weitere Versuche und Überlegungen etwa über die Lokalisation oder einen eventuellen Wirkungsmechanismus des verfütterten Eisens zwecklos.

Umsomehr interessiert die Frage, *wodurch* die Diskrepanz zwischen den früheren Resultaten, die sicherlich nicht als Zufallsergebnis anzusehen sind (vgl. Tabelle 1) und unseren Befunden bedingt ist. Eine Erklärung ergibt sich aus der folgenden Überlegung: Wie die Tabellen 3—6 zeigen und wie die Untersuchungen anderer Autoren über das Absinken der Mutationsrate vom 1. auf den 2. Tag bestätigen, besteht für Letalfaktoren wie Translokationen ein ausgesprochenes postmeiotisches (2. + 3. Tag nach der Bestrahlung) Sensibilitätsminimum<sup>1</sup>, dessen mögliche Ursachen bei TRAUT (1960) diskutiert werden. Es ist nun nicht auszuschließen, daß BUCHMANN et al., da damals die Reifegradabhängigkeit weniger bekannt war, die Kontroll-♂♂ nicht wie die eisengefütterten ♂♂ 4 Tage lang ohne ♀♀ gehalten, sondern sie vor der Bestrahlung den Massenkulturen entnommen haben. Dann kann man aber annehmen, daß die Eisen-♂♂ eine größere Menge reifer Spermien gespeichert hatten als die Kontroll-♂♂, da für jene ständig Gelegenheit zur Kopulation bestand. Somit besäßen die Eisen-♂♂ mehr sensible Brut A-Spermien als die Kontroll-♂♂, und den Mutationsraten der Buchmannschen Eisenversuche lägen mehr Brut A-Spermien im Vergleich zu relativ unsensiblen Brut B-Spermien zugrunde als den zugehörigen Kontrollen (Eltern nach etwa 4 Tagen entfernt, GVP = 1:1): Der Unterschied zwischen beiden Bruten (A und B) könnte so einen Eiseneffekt vortäuschen. Bei unseren Untersuchungen dagegen wurden die Kontroll-♂♂ wie die Eisen-♂♂ 4 Tage lang ohne ♀♀ gehalten: daher entsprechen unsere Kontrollraten Spermien der gleichen Empfindlichkeit, wie sie die Spermien der Eisenversuche besitzen.

Speziell hierzu angestellte Versuche hielten sich eng an die Methodik BUCHMANNs (entsprechend Versuch 4, Tabelle 2), doch verblieben die *P* ♂♂ bis zur Bestrahlung in Massenkulturen und wurden dann im Alter von 1—6 Tagen bestrahlt. Die Letalenrate betrug 4,4% (83/1876), ein Wert, der signifikant kleiner ist ( $P = 0,0023$ ) als der unserer vergleichbaren Kontrollen (Tabelle 7), bei denen die *P* ♂♂ 4 Tage lang ohne ♀♀ gehalten worden waren (6,4% = 210/3272). Selbst, wenn der Wert 4,4% zufällig besonders niedrig sein sollte, dürfte unsere oben angestellte Überlegung zur Ursache der Diskrepanz durch diesen Befund gestützt werden.

In diesem Zusammenhang seien die Untersuchungen von YANDERS (1956) angeführt: *Drosophila melanogaster* ♂♂ wurden ohne ♀♀ gehalten und vor der Bestrahlung in 2 Gruppen geteilt: Die eine kam für einen Tag zu einem ♀♀-Überschuß, die andere blieb ungepaart. Danach wurden beide Gruppen bestrahlt und die Raten rezessiv geschlechtsgebundener Letalfaktoren der Spermien des 1. Tages nach der Bestrahlung bestimmt (M-5). Es zeigte sich, daß die ♂♂, die 7 oder mehr

<sup>1</sup> Der Begriff „Sensibilität“ schließt hier Restitution mit ein, z.B. niedrige Sensibilität wegen hoher Restitutionshäufigkeit.

Tage lang ohne ♀♀ gehalten worden waren, signifikant höhere Raten ergaben als die gepaarten ♂♂ (deren Raten unabhängig von ihrem Alter waren). YANDERS deutet dies folgendermaßen: Die ungepaarten ♂♂ besitzen z. Z. der Bestrahlung mehr reife Spermien höheren Alters als die gepaarten. Alte reife Spermien seien aber empfindlicher als junge, eine Vermutung, die unseres Erachtens dadurch gestützt wird, daß in begatteten ♀♀ bestrahlte Spermien („nur alte reife Spermien“) höhere Letalen- und Translokationsraten ergeben als Spermien des ersten Tages nach der Bestrahlung („alte plus junge reife Spermien“), wobei „alt“ vielleicht mit „völlig reif“ gleichzusetzen ist. Die Interpretation YANDERS stimmt grundsätzlich mit unserer Überlegung zur Ursache der Diskrepanz überein. Während aber in unserem Fall die größere Empfindlichkeit der Brut A-Spermien (1. Tag) im Vergleich zu der der Brut B-Spermien (2. + 3. Tag) maßgeblich ist, kommt es bei YANDERS auf Sensibilitätsunterschiede innerhalb der Spermien des 1. Tages an, entsprechend dem Umstand, daß in unserer Anordnung die Eltern erst nach 4, bei YANDERS schon nach 1 Tag entfernt worden waren.

Möglicherweise sind die — statistisch nicht gesicherten — Befunde von RAPO-PORT (1943) in der gleichen Weise zu erklären (vgl. Tabelle 1).

### Summary

The increase in x-ray induced rate of recessive sex-linked lethals in *Drosophila melanogaster* by feeding of iron-saccharate, reported previously, has led to some far reaching conclusions about the participation of indirect mechanisms in the radiation induced mutation process.

However, in large scale experiments we were not able to reproduce this effect. Some of our tests represent an exact repetition of the former genetical and radiation procedures, in others further parameters (translocations, state of maturity of the irradiated germ cells, feeding of iron-II-gluconate) were considered.

A certain factor of the former genetical technique, representing a neglect of the dependence of the mutation rate on the state of maturity of the irradiated germ cells, is experimentally shown to be the probable cause of that discrepancy.

Consequently, the speculations based on the earlier results seem to require reconsideration.

Die neuerliche eingehende Prüfung des besprochenen Problems wurde von Herrn Prof. Dr. K. G. ZIMMER angeregt. Ihm, sowie Herrn Prof. Dr. A. CATSCH danke ich für zahlreiche Diskussionen, Herrn Dr. A. MÜLLER für Beratung bei der Bestrahlungstechnik, Fräulein U. APITZSCH für sorgfältige Mitarbeit.

### Literatur

- ABRAHAMSON, S.: The influence of oxygen on the X-ray induction of structural changes in *Drosophila* oocytes. *Genetics* **44**, 173 (1959).  
 D'AMATO, F., and A. GUSTAFSSON: Studies on the experimental control of the mutation process. *Hereditas* (Lund) **34**, 181 (1948).  
 BAUER, H.: Genetische Wirkungen von kurzwelligen und Korpuskularstrahlungen. *Fiat Rev.* **21**, 66 (1948).  
 BERSIN, TH.: Über die Konstitution des Eisen-3-saccharates. *Pharm. Acta Helv.* **26**, 407 (1951).  
 BORN, H. J., u. K. G. ZIMMER: Zur Frage der Steigerung der mutationsauslösenden Wirkung der Röntgenstrahlen durch Einbringung schweratomiger Salze in den Organismus. II. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **78**, 246 (1940).

- BUCHMANN, W., u. J. HOTH: Versuche an *Drosophila melanogaster* über den Einfluß von *Ferrum oxydatum saccharatum liquidum* auf die Mutationsauslösung durch Röntgenstrahlen. Biol. Zbl. **57**, 355 (1937).
- BUCHMANN, W., u. G. SYDOW: Weitere Versuche an *Drosophila melanogaster* über den Einfluß von Schwermetallsalzen auf die Mutationsauslösung durch Röntgenstrahlen. Versuche mit Uranylacetat. Biol. Zbl. **60**, 137 (1940).
- BUCHMANN, W., u. K. G. ZIMMER: Zur Frage der Steigerung der mutationsauslösenden Wirkung der Röntgenstrahlen durch Einbringung schweratomiger Salze in den Organismus. I. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **78**, 148 (1940).
- BUCHMANN, W., u. K. G. ZIMMER: Zur Frage der Steigerung der mutationsauslösenden Wirkung der Röntgenstrahlen durch Einbringung schweratomiger Salze in den Organismus. III. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **79**, 192 (1941).
- CATCHESIDE, D. G.: Genetic effects of radiations. *Advanc. Genet.* **2**, 271 (1948).
- IVES, P. T.: The mutation rate in *Drosophila* after high doses of gamma radiation. *Nat. Acad. Sci.* **45**, 188 (1959).
- MEDVEDEV, N.: The production of mutations in *Drosophila melanogaster* by the combined influence of X-rays and salts of heavy metals. *C. R. Acad. Sci. URSS.* **230** (1933).
- MULLER, H. J.: The manner of production of mutations by radiation. *Radiation Biology* (edit. by A. HOLLAENDER), vol. I, p. 475. New York-Toronto-London: McGraw-Hill Book Comp. 1954.
- MULLER, H. J.: The relation of neutron dose to chromosome changes and point mutations in *Drosophila*. I. Translocations. *Amer. Naturalist* **88**, 437 (1954).
- OSTER, I. I.: Radiosensitivity. *Genen en Phaenen* **3**, 53 (1958).
- PORTER, G., and M. R. WRIGHT: Intramolecular and intermolecular energy conversion involving change of multiplicity. *Discuss. Faraday Soc.* No **27**, 18 (1959).
- RAPOPORT, J. A.: Oxydation and the mechanism of action of mutagenous factors. *Ž. Obščei Biol.* **4**, 65 (1943).
- SCHOLES, G., and J. WEISS: Chemical action of X-rays on nucleic acids and related substances. *Chemistry and physiology of the nucleus*, p. 219. New York: Academic Press 1952.
- SCHÜTZE, R.: Die Beeinflussung der Mutationsrate bei *Drosophila melanogaster* durch kombinierte Behandlung mit Arsen und Röntgenstrahlen. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **81**, 484 (1943).
- STADLER, L. J.: Mutations in barley induced by X-rays and radium. *Science* **68**, 186 (1928).
- STONE, W. S., F. HAAS, M. L. ALEXANDER and F. E. CLAYTON: Comments on the mechanism of action of radiations on living systems. *Univ. Texas Publ.* No **5422**, 244 (1954).
- TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, N. W., u. K. G. ZIMMER: Wellenlängenunabhängigkeit der mutationsauslösenden Wirkung der Röntgen- und  $\gamma$ -Strahlen bei *Drosophila*. *Strahlentherapie* **54**, 265 (1935).
- TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, N. W., u. K. G. ZIMMER: Strahlengenetik. *Strahlentherapie* **66**, 684 (1939).
- TIMOFÉEFF-RESSOVSKY, N. W., u. K. G. ZIMMER: *Das Trefferprinzip in der Biologie*. Leipzig: Hirzel 1947.
- TRAUT, H.: Über die Abhängigkeit der Rate strahleninduzierter Translokationen und rezessiv geschlechtsgebundener Letalfaktoren vom Stadium der Spermatogenese bei *Drosophila melanogaster*. *Z. Vererb.-Lehre* (1960, im Druck).
- YANDERS, A. F.: An influence of aging mature sperm upon X-ray induction of sex-linked recessive lethals. *Genetics* **41**, 667 (1956).
- ZIMMER, K. G.: Studien zur quantitativen Strahlenbiologie. *Abh. Akad. Wiss. u. Lit. Mainz, math.-nat. Kl.* **30** (1960).

Dr. H. TRAUT,  
 Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe,  
 Karlsruhe, Weberstr. 5



Aus dem Max Planck-Institut für Biologie, Abt. Melchers, Tübingen

# DIE WIRKUNG EINES KOMPLEXBILDNERS UND VON METALLIONEN AUF DIE AUSPRÄGUNG DES *SNAKY*- UND *MONSTRA*-CHARAKTERS BEI *PARAMAECIUM AURELIA*

Von

ROLAND MALY

(Eingegangen am 15. August 1960)

## Einleitung

Vor kurzem wurde in dieser Zeitschrift über Versuche berichtet, in denen bei zwei aberranten *Paramaecium*-Stämmen, die bei genetisch verschiedener Grundlage als gemeinsames Merkmal eine Hemmung der Zelltrennung zeigen, eine phänotypische Normalisierung durch Kultur in sauerstoffarmem Milieu oder durch Zusatz von Kohlenmonoxyd erreicht werden konnte. Im Zusammenhang mit Befunden über die Beeinflussung der Merkmalsausprägung durch Dinitrophenol und Jodessigsäure wurde geschlossen, daß beim *Monstra*-Stamm (*Mo*-Stamm) und *snaky* ein Teilschritt der Glykolyse besonders empfindlich gegen eine zu starke Atmung ist, also ein dem Pasteur-Effekt ähnliches Phänomen vorliegt (MALY 1960). Um unnötige Wiederholungen zu vermeiden, muß wegen der Art des Merkmals, seiner Variabilität und quantitativen Erfassung sowie wegen der genetischen Unterschiede zwischen dem *Mo*-Stamm und *snaky* auf die zitierte Arbeit und MALY (1958) verwiesen werden.

Die hier mitgeteilten Untersuchungen haben ergeben, daß die Merkmalsausprägung bei *snaky* mittels des Komplexbildners Äthylendiamintetraessigsäure (Merck Titriplex III, im folgenden nach der englischen Schreibweise EDTA genannt) enorm gesteigert werden kann, dagegen nur in geringem Maße die des *Mo*-Stammes. Der EDTA-Effekt ist durch Zusatz verschiedener zweiwertiger Metallionen aufhebbar, und es zeigte sich, daß Zusatz von  $\text{Fe}^{++}$ - oder  $\text{Co}^{++}$ -Ionen allein zum Medium genügt, um eine völlige Normalisierung der Kulturen zu erreichen.

Der erhebliche quantitative Unterschied zwischen *snaky* und *Mo*-Stamm in der Reaktion auf EDTA dürfte, wie in der Diskussion auszuführen sein wird, durch die verschiedene genetische Bedingtheit des gleichen Merkmals bei den beiden Stämmen verursacht sein.

## Material und Methoden

sind die gleichen wie in der zitierten Arbeit. Für die Kulturen wurde Salatmedium, beimpft mit *Aerobacter aerogenes*, verwendet. Die Metallsalze wurden ausschließlich als Sulfate geboten.

## Ergebnisse

**1. Der EDTA-Effekt und seine Kompensation durch Metallsalze.** Die dem Tiermaterial eigene Variabilität, die schon bei den Versuchen mit vermindertem Sauerstoffgehalt erwähnt wurde, äußert sich hier in bezug auf die niedrigste

wirksame Konzentration des Komplexbildners. Im allgemeinen wird EDTA bis zu Konzentrationen von  $10^{-4}$  mol vertragen, setzt allerdings bei *snaky* die Teilungsraten sehr stark herab, während der Normalstamm *d-4-6* und der *Mo*-Stamm nur gering in der Vermehrung gehemmt werden. Höhere Konzentrationen von EDTA als  $10^{-4}$  mol wirken allerdings auch beim Normal- und

Tabelle 1. Die Wirkung von EDTA auf die Merkmalsausprägung und Teilungsrate bei *snaky*, *Mo*- und Normalstamm

(Für alle Tabellen gilt: % uv. T. = Prozentsatz unvollendeter Teilungen, T.r. = Teilungsrate, N = Gesamtzahl stattgefundenener Teilungen.)

Konzentration in mol	<i>snaky</i>			<i>Mo</i> -Stamm			Normal-Stamm		
	% uv. T.	T.r.	N	% uv. T.	T.r.	N	% uv. T.	T.r.	N
0									
(Kontrolle)	2,1	9,4	4140	0,6	8,7	7500	0	10,0	1218
$1,0 \times 10^{-5}$	2,0	9,4	4045	1,0	8,7	7635	0	10,1	1280
$2,5 \times 10^{-5}$	11,0	9,0	3025	3,0	8,8	8745	0	9,8	1100
$5,0 \times 10^{-5}$	35,2	4,8	159	1,4	8,7	7620	0	9,7	1012
$7,5 \times 10^{-5}$	38,5	4,3	109	2,6	8,5	6720	0	9,6	958
$1,0 \times 10^{-4}$	40,8	3,3	54	3,1	8,0	4500	0	9,6	922

*Mo*-Stamm tödlich. Das Auftreten von Monstra beim Normalstamm konnte selbst bei subletalen Konzentrationen niemals beobachtet werden, und beim *Mo*-Stamm ist die Verstärkung der Merkmalsausprägung (ausgedrückt als Pro-

Tabelle 2. Die Kompensation der EDTA-Wirkung durch Eisen und Kobalt (Material: *snaky*)

Konzentration in mol EDTA	Konzentration in mol $\text{FeSO}_4$	% uv. T.	T.r.	N
0	0	2,9	9,5	4420
(Kontrolle)				
$2,5 \times 10^{-5}$	0	7,8	9,4	4160
$2,5 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-5}$	0,5	9,4	11915
$2,5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$	0,1	9,3	11070
$2,5 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-4}$	0,06	9,6	13650
$2,5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-4}$	0,00	6,9	2110
	Konzentration in mol $\text{CoSO}_4$			
0	0	2,1	10,1	6635
(Kontrolle)				
$2,5 \times 10^{-5}$	0	4,1	9,7	5060
$2,5 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-5}$	0,2	9,8	15915
$2,5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$	0,0	7,8	4035
$2,5 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-4}$	0,0	2,0	90

zentsatz unvollendeter Teilungen) nur unwesentlich erhöht. Für den *Mo*-Stamm liegen genug Versuchsdaten vor, die gar keine Verstärkung der Monstrabildung durch EDTA erkennen lassen, im Gegensatz zu *snaky*, wo die Wirkung des Komplexbildners stets erfolgt und so weit geht, daß in den Kulturen überhaupt keine einzelnen Tiere, sondern nur Monstra gefunden werden (Tabelle 1).

Nähere Aufschlüsse über den zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus könnten erwartet werden, wenn es gelänge, den EDTA-Effekt auf die Merkmalsausprägung mit einzelnen zweiwertigen Metallionen zu kompensieren.

Aus dem eben Gesagten ergibt sich, daß für derartige Versuche nur *snaky* verwendbar war.

Von den geprüften Sulfaten waren Mangan und Magnesium ohne Wirkung, während Eisen, Kobalt, Kupfer, Nickel und Zink in geeigneten Konzentrationen die Wirkung des Komplexbildners auf die Zelldurchschnürung zu kompensieren vermochten. Eisen- oder Kobaltsulfat, im Überschuß zum Komplexbildner

zugesezt, hoben nicht nur die merkmalsverstärkende Wirkung vom EDTA auf, sondern normalisierten die Kulturen: jedwede Monstrabildung war unterbunden (Tabelle 2).

**2. Die Normalisierung von *snaky* und *Mo*-Stamm durch Metalle.** Nach dem Ergebnis des in Tabelle 2 dargestellten Versuches ist Eisen oder Kobalt allein mstande, den Defekt in den *snaky*-Zellen zu beheben. Die Zelldurchschnürung verläuft normal.

Diese Beobachtung ist durch vielfache Wiederholungen mit dem alleinigen Zusatz von Eisen- oder Kobaltsulfat zum Medium immer wieder bestätigt worden, und zwar wird nicht nur *snaky*, sondern auch der *Mo*-Stamm durch Eisen oder Kobalt normalisiert.

*Mo*-Stamm und *snaky* unterscheiden sich in ihrer Reaktion auf die Metallionen in ähnlicher Weise wie gegenüber Sauerstoffmangel (l. c. S. 229): die Normalisierung geht bei *snaky* vollkommener und schneller vor sich als beim *Mo*-Stamm (Tabelle 3).

Tabelle 3. Die normalisierende Wirkung von Eisen- und Kobaltsulfat

$\alpha \text{FeSO}_4$				$\beta \text{CoSO}_4$			
Konzentra- tion in mol	% uv. T.	T.r.	N	Konzentra- tion in mol	% uv. T.	T.r.	N
a) <i>snaky</i>							
0 (Kontrolle)	4,0	8,7	4300	0 (Kontrolle)	5,0	9,5	4220
$10^{-6}$	1,2	8,5	3970	$10^{-9}$	2,5	9,8	5320
$10^{-5}$	0,3	8,7	4635	$10^{-8}$	1,3	9,8	5320
$10^{-4}$	0,04	8,9	5256	$10^{-7}$	0,9	10,0	6000
				$10^{-6}$	0,03	9,8	16125
				$10^{-5}$	0,03	9,5	12840
b) <i>Mo</i> -Stamm							
0 (Kontrolle)	0,7	8,9	8670	0 (Kontrolle)	0,7	9,2	10530
$1,0 \times 10^{-5}$	0,5	9,0	9270	$1,0 \times 10^{-5}$	0,9	8,7	7480
$5,0 \times 10^{-5}$	0,5	8,9	8925	$2,5 \times 10^{-5}$	0,0	7,3	2910
$5,0 \times 10^{-4}$	0,02	9,0	9225	$5,0 \times 10^{-5}$	0,0	5,0	564
$7,5 \times 10^{-4}$	0,00	9,0	9045				

Es ist für die Kobaltwirkung beim *Mo*-Stamm charakteristisch, daß eine normalisierende Wirkung oft erst bei solchen Konzentrationen beobachtet wird, welche die Teilungsraten schon erheblich herabsetzen.

Eine teilweise Normalisierung ließ sich bei *snaky* durch Zink, Kupfer und Nickel erreichen, aber selbst bei optimalen Konzentrationen (Zink und Kupfer  $10^{-7}$ , Nickel  $5 \times 10^{-7}$  mol) war die Merkmalsausprägung nur um etwa die Hälfte herabgesetzt. Im Gegensatz zu der spezifischen Wirkung von Eisen und Kobalt, die um so vollständiger normalisieren, je höher die Konzentration ist, zeigen Zink, Kupfer und Nickel nur einen eng begrenzten Konzentrationsbereich, in dem eine Verminderung der Monstrabildung zu beobachten ist.

Die wichtige Frage, ob auch dreiwertige Eisen- und Kobaltsalze die Monstrabildung zu unterdrücken vermögen, kann an lebendem Material — noch dazu in einem bakterienhaltigen Milieu — nicht entschieden werden; die Reduktion zum zweiwertigen Zustand wäre unkontrollierbar.



**3. EDTA-Effekt und Atmung.** Monstrabildung durch EDTA wird zwar noch bei einem auf 2% verringerten Sauerstoffgehalt oder bei geringen (2,5—5%) Kohlenmonoxydzusätzen hervorgerufen, sie bleibt aber aus, wenn der Sauerstoffdruck noch weiter herabgesetzt respektive die Kohlenmonoxyd-Dosis gesteigert wird.

### Diskussion

Die Befunde über die starke Wirkung des Komplexbildners EDTA auf *snaky*-Zellen im Sinne einer Verstärkung des genetisch fixierten Defektes der Zelltrennung und ihre Kompensation durch Eisen und Kobalt erlauben den Schluß, daß an dem Zustandekommen der Störung eine dissoziierende Schwermetallverbindung beteiligt ist. Der schon früher beschriebenen Normalisierung durch geringe Kohlenmonoxydmengen (der CO-Effekt ist lichtreversibel) und Sauerstoffmangel stehen nun die in gleichem Sinne wirkenden Zusätze von Eisen und Kobalt (teilweise auch Zink, Kupfer und Nickel) an der Seite. Die Austauschbarkeit von Eisen und Kobalt schließt die Möglichkeit aus, daß für das Entstehen von Monstra bei Kulturen des *Mo*-Stammes und *snaky* ein Defekt in einem Ferment der Atmungskette verantwortlich sein kann.

Es ist vielmehr anzunehmen, daß bei den abnormen Paramaecienstämmen der „atmungsempfindliche“ Teilschritt der Glykolyse identisch ist mit der „EDTA-empfindlichen“ und durch Kobalt und Eisen reaktivierbaren Reaktion. Nach den Arbeiten von WARBURG und CHRISTIAN (1942) zeigt die Hefe-Zymohexase (Aldolase) — aber nicht die Muskelaldolase — ein dem hier beschriebenen Phänomen weitgehend ähnliches Verhalten gegenüber Komplexbildnern und Schwermetallen. WARBURG (1948, S. 166) äußerte später die Vermutung, daß die Pasteur-Reaktion allein erklärt werden könne durch Annahme einer Oxydation einer komplexen Ferroverbindung in der gärenden Zelle, da die Hefe-Zymohexase wohl durch zwei-, aber nicht durch dreiwertiges Eisen aktivierbar ist.

Wir haben gesehen, daß EDTA bei Tieren des Normalstammes keine Monstrabildung induzieren kann und beim *Mo*-Stamm die Häufigkeit unvollendeter Teilungen nur unerheblich, wenn überhaupt, erhöht. Diese Beobachtung findet ihre interessante Parallele in Versuchen mit erhöhten Sauerstoffgaben, die schon früher erwähnt (MALY 1960, S. 230) und inzwischen mehrfach wiederholt wurden. Eine Steigerung der Monstrabildung bei Kultur unter einer sehr sauerstoffreichen Atmosphäre (40, 60, 80, 95% O<sub>2</sub>) ist wohl bei *snaky* auf das 2—4fache des Kontrollwertes, aber nicht beim *Mo*-Stamm möglich. Der Unterschied zwischen *snaky* und *Mo*-Stamm gegenüber EDTA und erhöhtem Sauerstoffgehalt ist durch die verschiedenen genetischen Grundlagen des gleichen Merkmals erklärbar.

Für den *Mo*-Stamm wurde nachgewiesen (MALY 1958), daß das Merkmal „Hemmung der Zelltrennung“ durch defekte Partikeln eigener genetischer Kontinuität im Plasma verursacht wird und das Plasma von Tieren des *Mo*-Stammes ein Gemisch von normalen und defekten Partikeln — ähnlich dem Gemisch normaler und mutierter Platiden in einer albomaculaten Form bei Pflanzen — enthält. Dabei ist es für die gegenwärtige Erörterung belanglos, daß der irreversible Defekt in den mutierten Partikeln durch ein Gen induziert wird (MALY 1958, S. 410ff. und 417ff.). Der *snaky*-Charakter dagegen ist durch eine einfache Genmutation bedingt, die — will man das Plastidenmodell wieder heranziehen — einer *albina*-Form entspricht: alle Partikeln sind durch die Gen-

wirkung zu „defekt“ modifiziert. Da beim Normalstamm weder durch Sauerstoffreichtum, Jodessigsäure noch EDTA eine Monstrabildung hervorgerufen werden kann, steht fest, daß die normalen Partikeln unempfindlich gegen die genannten Einflüsse sind. Bei *snaky* sind offenbar alle Partikeln in der gleichen Weise durch das Gen modifiziert und empfindlich gegen EDTA und starke Atmung. Der Effekt des Komplexbildners muß daher bei *snaky* viel drastischer sein als bei Tieren des *Mo*-Stammes, in denen nur ein Teil der Partikeln defekt und damit empfindlich gegen EDTA oder Sauerstoffreichtum ist. Tabelle 1 zeigt auch das übereinstimmende Verhalten der Teilungsraten beim Normal- und *Mo*-Stamm in krassem Gegensatz zu *snaky*.

Es ist verlockend, die Parallele der Unterschiede — nämlich die Unempfindlichkeit bzw. die Empfindlichkeit gegenüber dem Komplexbildner — zwischen den normalen Partikeln und defekten (bzw. vom *snaky*-Gen zu „defekt“ modifizierten Partikeln) und denen zwischen Muskel- und Hefealdolase hervorzuheben.

Weitere Fortschritte sind nun nicht mehr von biologischen Versuchen, wie den hier beschriebenen, sondern nur mehr von der Erfassung enzymchemischer Unterschiede zwischen den drei Stämmen zu erwarten.

### Summary

This paper presents new facts on the problem of the inherited defects of cell separation in *Paramecium aurelia* (*Mo*-strain and *snaky*, cf. MALY 1958, 1960).

The complexing agent EDTA, when added to the culture medium, causes a drastic increase in monster formation in the *snaky*-strain, a much smaller increase in the *Mo*-strain and no effect in the normal strain. This effect can be compensated by the addition of different metal ions and evidence is presented that the addition of iron or cobalt to the medium normalises the *snaky*- and *Mo*-strains: the separation of the cells runs normally. It is suggested that the aldolase in the *snaky*-strain and in the „defective“ particles of the *Mo*-strain differs from that in the normal strain.

Fräulein R. NIERLICH danke ich für ihre Mitarbeit.

### Literatur

- MALY, R.: Eine genetisch bedingte Störung der Zelltrennung bei *Paramecium aurelia* var. 4. Ein Beitrag zum Problem der Mutabilität plasmatischer Systeme. Z. Vererb.-Lehre **89**, 397 (1958).  
— Die Normalisierung genetisch bedingter Defekte der Zelltrennung bei *Paramecium aurelia* durch Sauerstoffmangel und Kohlenmonoxyd. Z. Vererb.-Lehre **91**, 226 (1960).  
WARBURG, O.: Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten. Berlin 1948.  
—, u. W. CHRISTIAN: Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Zymohexase. Biochem. Z. **314**, 149 (1943).

Dr. ROLAND MALY, Max Planck-Institut für Biologie, Abt. Melchers,  
Tübingen, Corrensstr. 41

Aus dem Institut für Entwicklungsphysiologie der Universität zu Köln  
(Direktor: Prof. Dr. CORNELIA HARTE)

DAS SOMATISCHE MUTANTENSPEKTRUM  
VON *EPHESTIA KÜHNIELLA* Z. BEI VERSCHIEDENEN DOSEN  
WEICHER 10 kV- UND MITTELHARTER 100 kV-RÖNTGENSTRAHLEN  
SOWIE DER HARTEN  $^{60}\text{Co}$ -STRAHLUNG\*

Von

ERNST-ARNOLD LÖBBECKE und ILSE MÜLLER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. August 1960)

A. Einleitung

Schon wiederholt wurde das Problem aufgeworfen, ob eine selektive Mutationsauslösung möglich ist, d. h. ob Bedingungen zu finden sind, unter denen erwünschte genetische Veränderungen mit großer Häufigkeit auftreten, ohne daß zugleich die Häufigkeit schädlicher Mutationen gesteigert wird. Es ist bekannt, daß die einzelnen Loci mit verschiedener Häufigkeit mutieren, nicht nur spontan, sondern auch unter den Bedingungen der experimentellen Mutationsauslösung, so daß sich für jedes Objekt ein charakteristisches Mutantenspektrum aufstellen läßt. Allgemeiner gesagt steht also die Frage zur Diskussion, ob das Mutantenspektrum eines bestimmten Versuchsobjektes immer gleichbleibend ist, oder ob eine Verschiebung der relativen Häufigkeit der einzelnen Mutanten auftreten kann. Die erste Teilfrage des hierdurch aufgeworfenen Fragenkomplexes ist, ob eine solche Verschiebung in Abhängigkeit vom mutationsauslösenden Agens beobachtet werden kann. Die in den letzten Jahren veröffentlichten Untersuchungen von EHRENBURG und NYBOM (1954) und FRITZ-NIGGLI (1958) deuten auf eine solche selektive Wirkung verschiedener Strahlenarten hin. Eine eindeutige Entscheidung kann aber auf Grund dieser Versuche nicht getroffen werden, weil das Material aus verschiedenen Untersuchungen zusammengestellt war und daher nicht als homogen anzusehen ist, und zum anderen die Mutantenzahlen sehr gering sind. Als ein Objekt, das für derartige Untersuchungen besonders geeignet ist, erwies sich die Mehlmotte *Ephestia kühniella* (POHLEY 1953, LÖBBECKE und MÜLLER 1959). Auf den Hinterflügeln dieser Kleinschmetterlinge tritt nach Bestrahlung der Flügelanlagen in der Raupe oder jungen Puppe ein Spektrum gut zu unterscheidender somatischer Mutanten auf. Außerdem ist es relativ leicht, ein großes, in sich homogenes Versuchsmaterial zu erhalten. Für die Mutationsauslösung wurden Röntgenstrahlen verwendet und die Unterschiede der Strahlenqualität durch die verschiedenen Bremsspektren im Bereich von 10—100 kV geschaffen. In der ersten Veröffentlichung (LÖBBECKE und MÜLLER 1959) wurde zunächst die Wirkung dieser verschiedenen Bremsspektren auf die somatischen

\* Die Untersuchungen wurden im Auftrag des Sonderausschusses Radioaktivität durchgeführt und vom Bundesministerium für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft unterstützt. Wir danken Frau Prof. Dr. C. HARTE für die Anregung zu diesen Untersuchungen und kritische Durchsicht des Manuskripts.



Mutationen bei gleichbleibender Dosis von 600 r geprüft. Dabei stellte sich heraus, daß die biologische Variabilität die Mutantenhäufigkeit stärker beeinflusst als Veränderungen des Bremsspektrums.

Mit der Untersuchung einer einzigen Dosis kann die Frage nach der Selektivität der mutationsauslösenden Wirkung verschiedener Strahlenarten jedoch noch nicht befriedigend beantwortet werden. Eine bessere Grundlage für einen Vergleich ist durch die Dosiswirkungskurve gegeben. Wenn qualitativ verschiedene Strahlenarten die Mutationsrate der einzelnen Loci unterschiedlich beeinflussen, so müßte die Dosiswirkungskurve für jeden Mutantentyp einen verschiedenen Verlauf haben, d.h. Form und Steigungsgrad dieser Kurven müßten Unterschiede erkennen lassen. Im folgenden sollen daher für jede der vier untersuchten Schuppenmutanten die Dosiswirkungskurven nach Bestrahlung mit 10- und 100 kV-Röntgenstrahlen und  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung aufgestellt und miteinander verglichen werden.

Zur Bestrahlung kamen wiederum 10–16 Std alte Puppen. In diesem Entwicklungsstadium ist die Anzahl der Schuppenstammzellen bereits determiniert. Eine jetzt ausgelöste Mutation kann sich somit nur noch an einer Schuppe manifestieren, und die Zahl der mutierten kann zur Zahl der nicht mutierten Schuppen in Beziehung gesetzt werden. Im untersuchten Flügelbereich des Hinterflügels zwischen den Adern Radius und Axillaris  $\alpha$  stehen etwa 7000 Schuppen. Daraus ergibt sich die Mutationsrate als Anzahl der mutierten Schuppen je Flügel.

## B. Material und Methode

Das Tiermaterial lieferte ein schon lange in Inzucht gehaltener Wildstamm von *Ephestia kühniella* Z. Die Zuchtbedingungen, Altersbestimmung und die Präparation der Flügel wurden wie früher durchgeführt (l. c.). Um ausreichendes Zahlenmaterial zu erhalten, bestand jede Gruppe aus 35 Tieren = 70 Hinterflügel. Die Versuche zu den Dosiswirkungskurven für die 10 kV- und 100 kV-Röntgenstrahlung wurden in 2 Serien (Versuch 1 und 2) zu verschiedenen Zeiten im Jahre 1958 im Institut durchgeführt. Die Bestrahlung mit  $^{60}\text{Co}$  erfolgte im Spätherbst 1957 und fand im Institut für Physikalische Chemie der Universität Köln statt<sup>1</sup>. Die äußeren Bedingungen konnten bei den  $^{60}\text{Co}$ -Versuchen nicht konstant gehalten werden. Vor allem durch den notwendigen Transport der Versuchstiere traten unkontrollierbare Temperaturschwankungen auf. Die Dosisangaben beziehen sich bei den Röntgenstrahlen auf Messungen in Luft mit einem Dosimeter des Typs Ionognom, für die  $^{60}\text{Co}$ -Strahlungen auf Messungen mit dem FeO-Verfahren.

Röntengerät: Müller RT 100, CHF/Hamburg, Oberflächentherapieöhre mit Wolfram-anode und Berylliumfenster. Die elektrischen Daten für die Bestrahlungen waren:

10 kV	8 mA	Be-Eigenfilter	10 cm Abstand	1200 r/min
100 kV	8 mA	1,7 mm Al	30 cm Abstand	137 r/min
$^{60}\text{Co}$	1,23 Mev			

Optische Ausrüstung: Standard-Mikroskop Zeiss mit den Objektiven Neofluar 16- und 40fach und Kompensationsokularen 8fach.

Statistische Auswertung: Regressionsrechnung nach MATHER (1954).

Den technischen Assistentinnen, Frau M. AACH-ALTHÜSER und Fräulein B. BRUNN danken wir für ihre Mithilfe bei den Versuchen und der mikroskopischen Auswertung.

## C. Versuchsergebnisse

### I. Aufbau der Versuchsserie

Die Dosiswirkungskurven der 4 Schuppenmutanten wurden sowohl für die mittelharte 100 kV- wie auch für die weiche 10 kV-Röntgenstrahlung zweimal in

<sup>1</sup> Herrn Prof. Dr. SCHMID und Herrn Dozent Dr. HENGLEIN, die durch ihr Entgegenkommen diese Bestrahlung ermöglichten, sprechen wir auch an dieser Stelle unseren Dank aus.

voneinander zeitlich getrennten Versuchen aufgestellt. Dabei wurde je eine 10 kV- und 100 kV-Serie gleichzeitig durchgeführt. Bei der 100 kV-Strahlung kamen 6 verschiedene Dosen (100, 200, 400, 600, 800 und 1000 r) zur Anwendung, bei der 10 kV-Stufe außer diesen noch 2 höhere Dosen (1600 und 2400 r). Die technischen Umstände erlaubten es nicht, die Bestrahlung mit  $^{60}\text{Co}$  zu wiederholen und auch niedrigere Dosen mit genügender Genauigkeit zu verwenden. Deshalb liegen nur einmalige Werte für 4 Dosen (400, 600, 800 und 1000 r) ohne Wiederholung vor. Die 4 Schuppenmutanten mit den Bezeichnungen ES 1, ES 2, ES 3 und ES 4 sind die gleichen wie in der ersten Veröffentlichung (l. c.).

Der Gang der statistischen Auswertung ist in allen Versuchen gleich. Da es auf den Vergleich der Dosiswirkungskurven ankommt, und dieser bei nichtlinearer Abhängigkeit schwierig ist, mußte zunächst nach einer Transformation gesucht werden, die eine lineare Abhängigkeit zwischen Dosis und Mutationsrate ergibt. Hierfür sind folgende Überlegungen maßgebend: Für die Dosis (= unabhängige Variable) steht fest, daß die eingestrahlte Dosis zwar in Luft mit hinreichender Genauigkeit gemessen werden konnte, aber durch die Absorption im Chitin und im Gewebe ein unbekannter Anteil verlorengeht. Die wirksame Dosis liegt also um diesen unbekannten Faktor  $x$  niedriger als die eingestrahlte Dosis. Hierdurch entsteht auf der Abszisse eine für weitere Berechnungen ungünstige geometrische Skala, die aber durch logarithmische Transformation in eine arithmetische Skala übergeführt werden kann. Die abhängige Variable ist in den Tabellen angegeben als die Anzahl der mutierten Schuppen auf 70 Flügeln mit je etwa 7000 Schuppen. Die Angabe bezieht sich also auf die Mutationsrate, den Anteil der mutierten Schuppen an der Gesamtzahl der bestrahlten Schuppen. Die geringen Schwankungen der Schuppenzahl auf den einzelnen Flügeln werden dadurch ausgeglichen, daß mit dem Mittelwert aus 70 Flügeln gearbeitet wird. Durch Anwendung der logarithmischen Transformation für die Ordinate kann auch hier eine arithmetische Progression erreicht werden. Eine Probit-Transformation wäre ebenfalls korrekt gewesen, erfordert aber wesentlich mehr Rechenarbeit und stößt bei diesen sehr geringen Prozentzahlen auf Schwierigkeiten.

Nach logarithmischer Transformation beider Achsen wurde für jeden Mutantentyp die Regressionslinie der Mutantenhäufigkeit in Abhängigkeit von der Dosis berechnet. Dann folgte der Linearitätstest dieser Regressionslinien nach MATHER (1954) zur Prüfung der Annahme, daß die durchgeführte Transformation tatsächlich zu einer linearen Beziehung der beiden Variablen führt. Dieser Test ist notwendig, weil die Linearität Voraussetzung für die weiteren Berechnungen ist. Danach konnte die Varianzanalyse der Regression der ganzen Serie durchgeführt werden. Diese gibt Auskunft auf die Frage, ob die Regressionslinien für die einzelnen Mutanten sich unterscheiden, d. h. aber, ob die Dosiswirkungskurven für die verschiedenen Mutanten identisch sind oder nicht.

## *II. Bestrahlung mit 100 kV-Röntgenstrahlen*

Dieser Versuch wurde mit 6 Dosen in 2 Wiederholungen durchgeführt. Die Bestrahlungen mit den verschiedenen Dosen einer Serie erfolgten jeweils in einer Versuchswoche, wobei Tiermaterial aus den gleichen Zuchtchalen verwendet wurde. In Tabelle 1 sind die Häufigkeiten der einzelnen Mutanten bei verschiedenen Dosen angegeben. Vergleicht man zunächst die Summen aller Mutanten der 4 Typen miteinander, so ergibt sich das gleiche Zahlenverhältnis zwischen den 4 Typen, das schon früher beobachtet wurde. Zwischen den beiden Versuchen lassen sich wieder Differenzen in der absoluten Häufigkeit der einzelnen Mutanten feststellen, wie auf Grund der ersten Untersuchungen zu erwarten war. Beide Versuche müssen daher getrennt bearbeitet werden.

Tabelle 1. Häufigkeit der 4 Schuppenmutanten in den beiden Versuchen mit verschiedenen Dosen von 100 kV Röntgenlicht. (Summe der mutierten Schuppen auf den Hinterflügeln von je 35 Tieren)

Dosis in r	Mutanten ES 1		Mutanten ES 2		Mutanten ES 3		Mutanten ES 4		$\Sigma$	
	Versuch		Versuch		Versuch		Versuch		Versuch	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
100	19	46	2	1	5	9	3	2	29	58
200	59	75	5	4	8	10	11	3	83	92
400	141	170	25	19	33	38	27	18	226	245
600	317	289	33	46	60	72	28	19	438	426
800	518	498	86	52	196	129	83	28	883	707
1000	712	791	98	78	181	239	101	70	1092	1178
$\Sigma$	1766	1869	249	200	483	497	253	140	2751	2706
	3635		449		980		393		5457	

Die Tabelle zeigt, daß in jedem Versuch die Häufigkeit der Mutanten mit steigender Dosis zunimmt, aber daß keine geradlinige Abhängigkeit zwischen Dosis und Mutantenzahl vorliegt. Für eine weitere statistische Bearbeitung ist also die beschriebene Transformation der Daten nötig. Der Verlauf der Dosiswirkungskurven vor und nach der Transformation für die 3 Mutantentypen ES 1, 2 und 3 ist in den Abb. 1 und 2 (a und b) dargestellt. Die Kurven für ES 4 fallen fast mit denjenigen für ES 2 zusammen und wurden nur aus Gründen der Übersichtlichkeit der Abbildungen fortgelassen. Zunächst wurde für jeden Mutantentyp in den 2 Versuchen die Regressionslinie für die Mutantenhäufigkeit in Abhängigkeit von der Dosis berechnet (Tabelle 2). Wie zu erwarten, sind alle Regressionskoeffizienten mit  $P < 0,001$  gesichert. Zur Prüfung der Annahme, daß nach der Transformation tatsächlich eine lineare Beziehung zwischen Dosis und Mutantenhäufigkeit besteht, wurde der Linearitätstest der Regressionslinien nach MATHER durchgeführt. Die Endanalyse dieser Berechnung ist in Tabelle 3 gegeben. Sie zeigt, daß vollkommene Linearität vorliegt, also die Transformation zum gewünschten Ergebnis geführt hat und eine Weiterarbeit mit diesen Daten gerechtfertigt ist.

Tabelle 2. Die Regressionsgleichungen der Dosiswirkungskurven für die 4 Mutanten nach Bestrahlung mit 100 kV-Röntgenlicht in den 2 Versuchen

Mu- tanten	Versuch 1	Versuch 2
ES 1	$y = 2,21 + 1,57 (x - 2,59)$	$y = 2,30 + 1,22 (x - 2,59)$
ES 2	$y = 1,31 + 1,76 (x - 2,59)$	$y = 1,19 + 1,93 (x - 2,59)$
ES 3	$y = 1,57 + 1,71 (x - 2,59)$	$y = 1,65 + 1,47 (x - 2,59)$
ES 4	$y = 1,39 + 1,46 (x - 2,59)$	$y = 1,10 + 1,50 (x - 2,59)$

Tabelle 3. Linearitätstest: Prüfung der linearen Abhängigkeit der Mutantenhäufigkeiten von der Dosis nach logarithmischer Transformation beider Achsen

	S. q. A.	Fr. Gr.	Varianz	F	P
Blöcke . . . .	8,18	3	2,73	1,72	0,2—0,05
Regressionen .	14,53	1	14,53		
Dosen . . . .	0,20	4	0,05		
Wechselwirkung	0,21	15	0,01		
Fehler . . . .	0,70	24	0,03		

Auf die Frage, zu deren Klärung der Versuch durchgeführt wurde, ob die Kurven für die 4 Mutanten die gleiche Form haben, d.h. ob im gewählten Raster die Regressionskoeffizienten gleich sind, und ob die zwischen den beiden Versuchen bestehenden Unterschiede zufällig sind oder nicht, gibt die varianzanalytische Bearbeitung der Regression Antwort (MATHER 1954) (Endanalyse in Tabelle 4). Die Mittelwerte der untersuchten Regressionslinien für die 4 Mutantentypen sind gesichert verschieden. Dies ist ein Ausdruck der unterschiedlichen



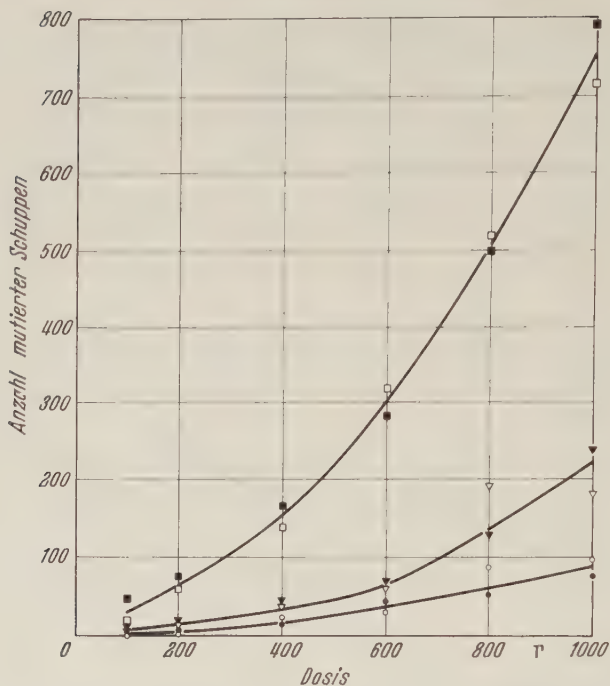


Abb. 1. Dosiswirkungskurven für die Schuppenmutanten ES 1, ES 2, ES 3 in den 2 Versuchen der 100 kV-Bestrahlung. Ordinate = Dosis in r; Abszisse = Anzahl der mutierten Schuppen auf 70 Flügeln. □ ES 1, 1. Versuch; ■ ES 1, 2. Versuch. ○ ES 2, 1. Versuch; ● ES 2, 2. Versuch; ▽ ES 3, 1. Versuch; ▼ ES 3, 2. Versuch

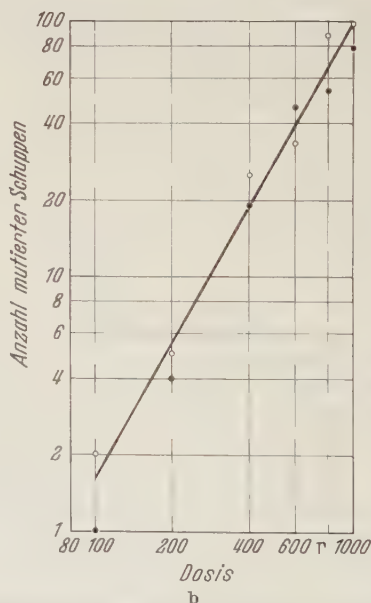
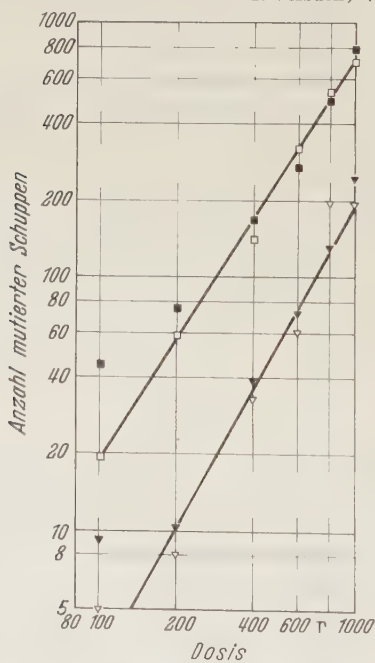


Abb. 2a u. b. Dosiswirkungskurven im doppelt logarithmischen Raster für die Schwerpunktmutanten ES 1 + ES 3 (a) und ES 2 (b) in den 2 Versuchen der 100 kV-Bestrahlung. Ordinate = Dosis in r; Abszisse = Anzahl der mutierten Schuppen auf 70 Flügeln. □ ES 1, 1. Versuch; ■ ES 1, 2. Versuch. ○ ES 2, 1. Versuch; ● ES 2, 2. Versuch. ▽ ES 3, 1. Versuch; ▼ ES 3, 2. Versuch

Tabelle 4. Varianzanalyse der Regression der 100 kV-Versuchsserie

	S. q. A.	Fr.- Gr.	Varianz	F oder t	P	F oder t gegen Rest	P
Gemeinsame Regression . . . .	14,950	1					
Differenz der Regressionen zwischen den Mutanten . . . .	0,165	3	0,055	$F_I$ 2,56	0,2	$F_{II}$ 3,94	0,2—0,05
Differenz der Regressionen zwischen den Wiederholungen . .	0,012	1	0,012	$t_I$ 1,32	0,3—0,2	$t_I$ 1,07	0,5—0,3
Wechselwirkung Mutanten $\times$ Wiederholung . . . . .	0,064	3	0,021				
Differenz zwischen den Mittelwerten der Mutanten . . .	86,769	3	25,589	$F_I$ 1,8678	0,001	$F_{II}$ 184,09	0,001
Differenz zwischen den Mittelwerten der Wiederholungen	1,440	1	1,440	$t_I$ 3,3	0,05—0,02		
Wechselwirkung Mutanten $\times$ Wiederholung . . . . .	0,513	3	0,137				
Rest . . . . .	0,4867	35	0,139				

absoluten Häufigkeit dieser Typen, die eine verschiedene Lage der Regressionslinie zur Folge hat. Die Differenz der Mittelwerte der beiden Wiederholungen ist nicht gesichert. Es besteht keine Wechselwirkung Mutantentyp  $\times$  Wiederholung. Hieraus folgt, daß der Unterschied der relativen Häufigkeit der 4 Typen in den beiden Versuchen im Rahmen des Zufälligen liegt. Die Regressionen zeigen keine gesicherten Unterschiede, weder zwischen den Mutantentypen noch zwischen den Versuchen, und entsprechend ist auch keine Wechselwirkung Mutantentyp  $\times$  Versuch vorhanden.

Nach einer Röntgenbestrahlung mit 100 kV sind die Dosiswirkungskurven der 4 Mutantentypen gleich und bei Wiederholung reproduzierbar. Hieraus folgt, daß das Mutantenspektrum bei dieser Bestrahlung unabhängig von der Dosis ist.

### III. Bestrahlung mit der $\gamma$ -Strahlung von $^{60}\text{Co}$

Die Häufigkeiten der 4 Mutantentypen nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen von  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ -Strahlung sind in Tabelle 5 eingetragen. Die Mutanten ES 1, ES 2 und ES 4 treten mit etwa denselben Häufigkeiten auf wie bei der entsprechenden Dosis der 100 kV-Strahlung. Auch das relative Verhältnis dieser 3 Mutanten bleibt etwa gleich. Der Typ ES 3 fällt in Tabelle 5 durch eine geringe Häufigkeit auf.

In Tabelle 6 sind die Regressionsgleichungen der Dosiswirkungskurven nach doppeltlogarithmischer Transformation angegeben, in Tabelle 7 die varianzanalytische Untersuchung der Regressionen. Zwischen den Mittelwerten bestehen gesicherte Differenzen, wie schon aus der Tabelle 5 zu ersehen war, während die Unterschiede zwischen den Regressionskoeffizienten nicht gesichert sind. Die Dosiseffekturkurven sind also bei der  $\gamma$ -Strahlung für alle 4 Mutantentypen gleich.

Tabelle 5. Häufigkeit der 4 Schuppenmutanten nach Bestrahlung mit <sup>60</sup>Co-γ-Strahlen bei 4 Dosen. (Summe der mutierten Schuppen auf den Hinterflügeln von je 35 Tieren)

Dosis in r	Mutanten				
	ES 1	ES 2	ES 3	ES 4	Σ
400	163	18	14	9	204
600	285	46	34	34	399
800	385	69	51	45	550
1000	750	155	155	91	1151
Σ	1583	288	254	179	2304

Tabelle 6. Die Regressionsgleichungen der Dosiswirkungskurven für die 4 Mutanten nach Bestrahlung mit <sup>60</sup>Co-γ-Strahlen

ES 1	$y = 2,53 + 1,57120 (x - 2,82)$
ES 2	$y = 1,73 + 2,23783 (x - 2,82)$
ES 3	$y = 1,64 + 2,44878 (x - 2,82)$
ES 4	$y = 1,01 + 2,40440 (x - 2,82)$

Tabelle 7. Varianzanalyse der Regression für die 4 Mutanten nach Bestrahlung mit <sup>60</sup>Co-γ-Strahlen

	S. q. A.	Fr. Gr.	Varianz	F	P
Gemeinsame Regression . . . .	1,6610				
Differenz der Regressionen zwischen den Mutanten . . .	1,1028	3	0,36763	— 3,902	0,05—0,01
Differenz zwischen den Mittelwerten der Mutanten . . . .	12,47	3	4,157	/ 44,223	< 0,001
Rest . . . . .	0,1037	11	0,0942		

IV. Bestrahlung mit 10 kV-Röntgenstrahlen

Der Versuch mit der 10 kV-Röntgenstrahlung wurde mit 8 Dosen und 2 Wiederholungen durchgeführt. Bei dieser sehr weichen Strahlung ist mit einer starken Absorption mit Chitin zu rechnen. Die nicht absorbierten Anteile der Bremsstrahlung von 10 kV-Röntgenstrahlen haben aber immer noch eine wesentlich größere Wellenlänge als die der mit 1,7 mm-Aluminium gefilterten 100 kV-Strahlung.

Zur Prüfung der Absorption wurden Dosismessungen durchgeführt, bei denen die Kammer des Dosimeters mit der aufgeschnittenen Chitinhülle einer Puppe bedeckt wurde. Dies ergab eine um etwa 10% geringere Dosis als bei unbedeckter Dosimeterkammer. Der Hinterflügel ist in der Puppe außerdem von dem Vorderflügel überlagert, der ebenfalls einen Anteil der Strahlung absorbiert. Bei dieser Versuchsserie kann daher nur die in Luft gemessene Dosis angegeben werden, während die wirksame Strahlenmenge im Gewebe um mindestens 10% niedriger liegt. Wenn auch eine genaue Dosisangabe nicht möglich ist, so ist doch der relative Anteil dieser Absorption bei jeder Dosis gleich, so daß das Verhältnis der eingestrahltten Energie zwischen den Einzelgruppen des Versuchs durch die Absorption nicht verändert wird. Durch die logarithmische Transformation wird diese Verminderung für alle Dosen linear, so daß der relative Abstand der Meßpunkte voneinander gewahrt bleibt. Da bei der Regressionsrechnung die absolute Größe der einzelnen Meßpunkte auf der x-Achse nicht im Regressionskoeffizienten in Erscheinung tritt, macht sich diese Unsicherheit der Dosisbestimmung für die Schlußfolgerungen, soweit nur die Regressionskoeffizienten verwendet werden, nicht bemerkbar. Ausgeschlossen ist nur ein Vergleich der gesamten Mutationsrate einer bestimmten Dosis dieser 10 kV-Strahlung mit den Ergebnissen aus Versuchen mit gleicher Dosisangabe der 100 kV- und <sup>60</sup>Co-Bestrahlungen zwecks Bestimmung der relativen biologischen Wirksamkeit der verschiedenen Strahlungen. Wenn es also möglich wäre, die genaue Dosis, die im Gewebe eingestrahlt ist, in die Tabellen einzusetzen, so würde dies sich in der Berechnung nur auf die Lage der Regressionslinie im Koordinatensystem auswirken,



aber nicht auf ihre Neigung, die in den Regressionskoeffizienten ausgedrückt wird. Nur die letzteren sind aber für den hier erstrebten Vergleich wichtig.

In Tabelle 8 sind die Werte für die einzelnen Mutantentypen nach Bestrahlung mit verschiedener Dosis eingetragen. Die Regressionslinien der verschiedenen Mutantentypen sind in Tabelle 9 enthalten, die Endanalyse in Tabelle 10. Die

Tabelle 8. Häufigkeit der 4 Schuppenmutanten in den beiden Versuchen mit verschiedenen Dosen von 10 kV-Röntgenlicht. (Summe der mutierten Schuppen auf den Hinterflügeln von je 35 Tieren)

Dosis in r	Mutanten ES 1		Mutanten ES 2		Mutanten ES 3		Mutanten ES 4		Σ	
	Versuch		Versuch		Versuch		Versuch		Versuch	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
100	11	19	4	1	10	4	3	1	28	25
200	23	21	1	4	5	8	2	8	31	41
400	52	50	9	8	16	12	7	6	84	76
600	118	105	7	9	25	21	12	7	162	142
800	157	202	21	26	60	56	20	26	258	310
1000	249	206	46	29	74	52	31	12	400	299
1600	544	489	84	67	137	94	89	64	854	714
2400	724	914	94	116	157	156	89	116	1064	1302
Σ	1878	2006	266	260	484	403	253	240	2881	2909
	3884		526		887		493		5790	

Differenz der Mittelwerte der beiden Wiederholungen ist wie die der 100 kV-Serie nicht gesichert. Die Regression der Häufigkeit in Abhängigkeit von der Dosis zeigt zwischen den Mutantentypen und zwischen den Versuchen keine Differenzen. Die Häufigkeit aller Mutantentypen nimmt mit steigender Dosis proportional zu, und die Ergebnisse beider Versuche stimmen in dieser Hinsicht überein. Hieraus folgt, daß auch bei der weichen Röntgenstrahlung sich mit steigender Dosis das Mutantenspektrum nicht verändert und dieses Ergebnis reproduzierbar ist.

Tabelle 9. Die Regressionsgleichungen der Dosiswirkungskurven für die 4 Mutanten in 2 Versuchen mit der 10 kV-Röntgenstrahlung

Mu- tanten	Versuch 1	Versuch 2
ES 1	$y = 2,05 + 1,37 (x - 2,77)$	$y = 2,07 + 1,29 (x - 2,77)$
ES 2	$y = 1,16 + 0,66 (x - 2,77)$	$y = 1,15 + 1,43 (x - 2,77)$
ES 3	$y = 1,54 + 1,09 (x - 2,77)$	$y = 1,44 + 1,17 (x - 2,77)$
ES 4	$y = 1,17 + 1,28 (x - 2,77)$	$y = 1,11 + 1,29 (x - 2,77)$

V. Vergleich der Dosiswirkungskurven in den 3 Versuchsserien

a) Vergleich der Regressionskoeffizienten. Nachdem festgestellt wurde, daß innerhalb jeder der 3 verschiedenen Versuchsgruppen die Dosiseffektkurven für die 4 Mutantentypen identisch sind, ist zu prüfen, ob diese Gruppen mit verschiedener Bestrahlung unter sich unterschiedlich sind. Hierzu wurden für jeden der 4 Mutantentypen je 2 Regressionslinien im *t*-Test miteinander verglichen. Die Ergebnisse dieser Prüfung sind in der Tabelle 11 (100 kV-Versuche verglichen mit <sup>60</sup>Co-Versuch) und Tabelle 12 (100 kV- und 10 kV-Versuche) enthalten. Für den Vergleich stehen 20 Regressionslinien, 5 für jede der 4 Mutanten, zur Verfügung.

Tabelle 10. Varianzanalyse der Regression für die 4 Mutanten in 2 Versuchen mit der 10 kV-Röntgenstrahlung

	S. q. A.	Fr. Gr.	Varianz	F oder t	P	F oder t gegen Rest	P
Gemeinsame Regression	17,449						
Differenz der Regression zwischen den Mutanten . . . . .	0,157	3	0,052	$F_I$ 2,150	0,2—0,05	$F_{II}$ 1,53	0,2
Differenz der Regression zwischen den Wiederholungen . .	0,113	1	0,113	$t_I$ 1,003	0,5—0,3	$t_{II}$ 1,18	0,3—0,2
Wechselwirkung Mutanten $\times$ Wiederholung . . . . .	0,341	3	0,114				
Differenz zwischen den Mittelwerten der Mutanten . . . . .	70,897	3	23,632	$F_I$ 238,70	< 0,001		
Differenz zwischen den Mittelwerten der Wiederholungen . .	0,142	1	0,142	$t_I$ 1,20	0,3—0,2		
Wechselwirkung Mutanten $\times$ Wiederholung . . . . .	0,289	3	0,099				
Rest . . . . .	3,802	47	0,081				

Tabelle 11. t-Teste der Regressionskoeffizienten der einzelnen Mutanten zum Vergleich der <sup>60</sup>Co-Linien mit denen der beiden 100 kV-Linien

	Mutanten			
	ES 1	ES 2	ES 3	ES 4
100 kV 1:100 kV 2	$d$ 0,347 $sd$ 0,114 $t_8$ 3,031 $P$ 0,02—0,01	$d$ 0,179 $sd$ 0,154 $t_8$ 1,120 $P$ 0,3—0,2	$d$ 0,237 $sd$ 0,272 $t_8$ 0,867 $P$ 0,5—0,3	$d$ 0,045 $sd$ 0,237 $t_8$ 0,185 $P$ 0,5—0,3
100 kV 1:Co	$d$ 0,00047 $sd$ 0,235 $t_6$ 0,002 $P$ > 0,9	$d$ 0,857 $sd$ 0,390 $t_6$ 2,197 $P$ 0,1—0,05	$d$ 0,739 $sd$ 0,465 $t_6$ 1,585 $P$ 0,2—0,1	$d$ 0,946 $sd$ 0,559 $t_6$ 1,692 $P$ 0,2—0,1
100 kV 2:Co	$d$ 0,346 $sd$ 0,257 $t_6$ 1,340 $P$ 0,3—0,2	$d$ 0,740 $sd$ 0,258 $t_6$ 2,860 $P$ 0,05—0,02	$d$ 0,975 $sd$ 0,468 $t_6$ 2,083 $P$ 0,05—0,02	$d$ 0,902 $sd$ 0,572 $t_6$ 1,576 $P$ 0,2—0,1

Dabei wurde nur einmal ein  $P < 0,01$  gefunden. Dies kommt daher, daß anscheinend die Regressionslinie für die Mutante ES 2 im zweiten Versuch der 10 kV-Serie etwas stärker abweicht und so im Vergleich mit den beiden entsprechenden Linien der 100 kV-Serie sich  $P$ -Werte ergeben, die an der Grenze der statistischen Sicherung liegen. Da aber innerhalb der 10 kV-Serie die Differenzen zwischen den Linien für die 4 Mutantentypen im Bereich des Zufälligen liegen und bei einer größeren Anzahl von parallel durchgeführten Vergleichen aus theoretischen Gründen damit gerechnet werden muß, daß darin auch ein Extremwert enthalten ist, darf dieser einen größeren Abweichung keine Bedeutung beigemessen werden.

Die Dosiseffektkurven zeigen demnach in allen Versuchen unabhängig von der gewählten Strahlungsquelle einen gleichartigen Anstieg. Die Erhöhung der

Tabelle 12. *t*-Teste der Regressionskoeffizienten der einzelnen Mutanten zum Vergleich der Linien für die 10 kV-Strahlung mit denen der 100 kV-Strahlung

		Mutanten			
		ES 1	ES 2	ES 3	ES 4
100 kV 1	10 kV 1	<i>d</i> 0,201 <i>sd</i> 0,114 <i>t</i> <sub>10</sub> 1,760 <i>P</i> 0,2—0,1	<i>d</i> 0,432 <i>sd</i> 0,292 <i>t</i> <sub>10</sub> 1,479 <i>P</i> 0,2—0,1	<i>d</i> 0,614 <i>sd</i> 0,252 <i>t</i> <sub>10</sub> 2,430 <i>P</i> 0,05—0,02	<i>d</i> 0,180 <i>sd</i> 0,208 <i>t</i> <sub>10</sub> 0,860 <i>P</i> 0,5—0,3
	10 kV 2	<i>d</i> 0,285 <i>sd</i> 0,269 <i>t</i> <sub>10</sub> 1,050 <i>P</i> 0,5—0,3	<i>d</i> 0,324 <i>sd</i> 0,142 <i>t</i> <sub>10</sub> 2,290 <i>P</i> 0,02—0,01	<i>d</i> 0,638 <i>sd</i> 0,596 <i>t</i> <sub>10</sub> 1,070 <i>P</i> 0,5—0,3	<i>d</i> 0,167 <i>sd</i> 0,256 <i>t</i> <sub>10</sub> 0,650 <i>P</i> 0,7—0,5
	100 kV 2	<i>d</i> 0,145 <i>sd</i> 0,151 <i>t</i> <sub>10</sub> 0,960 <i>P</i> 0,5—0,3	<i>d</i> 0,606 <i>sd</i> 0,290 <i>t</i> <sub>10</sub> 2,080 <i>P</i> 0,1—0,05	<i>d</i> 0,378 <i>sd</i> 0,193 <i>t</i> <sub>10</sub> 1,950 <i>P</i> 0,2	<i>d</i> 0,226 <i>sd</i> 0,241 <i>t</i> <sub>10</sub> 0,930 <i>P</i> 0,5—0,3
	10 kV 2	<i>d</i> 0,061 <i>sd</i> 0,285 <i>t</i> <sub>10</sub> 0,214 <i>P</i> 0,9—0,8	<i>d</i> 0,498 <i>sd</i> 0,140 <i>t</i> <sub>10</sub> 3,560 <i>P</i> 0,01—0,001	<i>d</i> 0,301 <i>sd</i> 0,216 <i>t</i> <sub>10</sub> 1,390 <i>P</i> 0,1—0,05	<i>d</i> 0,211 <i>sd</i> 0,284 <i>t</i> <sub>10</sub> 0,750 <i>P</i> 0,5—0,3

Mutationsrate nach Bestrahlung ist für alle 4 Mutanten immer proportional der Dosis, so daß das Mutantenspektrum gleich bleibt.

b) Vergleich des Mutantenspektrums in den 3 Serien mit verschiedenartiger Bestrahlung. Die vorstehend durchgeführte Prüfung zeigte, daß sich innerhalb jeder Bestrahlungsgruppe das Mutantenspektrum mit der Dosis nicht verändert. Sie gibt aber keine Auskunft darüber, ob nicht die Gruppen als Ganzes sich durch ihr Mutantenspektrum unterscheiden. Da die Dosis als verändernde Ursache wegfällt, ist es erlaubt, alle Teilversuche einer Gruppe zusammenzufassen, um festzustellen, ob die relative Häufigkeit der 4 Mutantentypen in allen Behandlungsserien gleich ist.

Tabelle 13. Häufigkeit der 4 Schuppenmutanten in den 2 Versuchen der 10- und 100 kV-Serie und <sup>60</sup>Co. (Summe der mutierten Schuppen auf den Hinterflügeln von je 35 Tieren; Daten aus den Tabellen 1, 5 und 8)

Be- strahlung	Ver- such	Mutanten				
		ES 1	ES 2	ES 3	ES 4	Σ
100 kV	1	1766	249	483	253	2751
	2	1869	200	493	140	2706
10 kV	1	1878	266	484	253	2881
	2	2006	260	403	240	2909
Co <sub>60</sub>		1583	288	259	179	2304

In Tabelle 13 sind die Summenzahlen aus den verschiedenen Versuchen zusammengestellt. Diese Tabelle dient als Grundlage für die in Tabelle 14 dargestellten Berechnungen. Die Prüfung kann durchgeführt werden als  $\chi^2$ -Zerlegung mit anschließendem Varianzvergleich. Hierzu wurde zunächst für die beiden Röntgenserien mit je 2 Wiederholungen das Gesamt- $\chi^2$  zerlegt in die Komponenten „zwischen Behandlungsgruppen“ und „zwischen Wiederholungen innerhalb der Gruppen“. Insgesamt sind die Unterschiede der relativen Häufigkeit der 4 Mutantentypen zwischen den 4 Versuchen viel größer, als durch Zufallswirkungen möglich wäre. Die relativ stärksten Schwankungen zeigen die Typen ES 2 und ES 3. Aus dem Varianzvergleich ergibt sich aber, daß die Differenz zwischen den beiden verschiedenen Bestrahlungen nicht größer ist als zwischen



Tabelle 14. *Untersuchung der Homogenität der Verteilung der Mutanten auf die 4 Typen in den 5 Bestrahlungsreihen*

Variationsursache	$\chi^2$	Fr. Gr.	Varianz	$F = V/V_{\text{Rest}}$	$P$
a) Vergleich der Röntgenversuche					
1. Total . . . . .	68,93	9			
2. Zwischen 10 und 100 kV . . . .	20,42	3	6,70	1,11	0,2
3. Zwischen Versuch 1 und 2 . . . .	30,51	3	10,13	1,68	
4. Rest . . . . .	18,00	3	6,00		
b) Zusammenfassung aller Versuche					
1. Total . . . . .	137,31	12			
2. Zwischen Behandlungen (10 kV, 100 kV, $^{60}\text{Co}$ ) . . . . .	86,98	6	14,48	1,73	0,2
3. In Behandlungen . . . . .	50,53	6	8,39		

den Wiederholungen. Auch wenn bei der Berechnung des  $\chi^2$  die  $^{60}\text{Co}$ -Serie mit hineingenommen wird, ist die auf „zwischen Behandlungen“ fallende Varianz nicht gesichert größer als die Varianz „innerhalb der Behandlungen“.

Insgesamt ist keine gesicherte Differenz aufzuzeigen, die auf die Wirkung der unterschiedlichen Bestrahlung zurückgeführt werden könnte. Die Differenzen zwischen den Wiederholungen sind von der Größenordnung, wie sie auch im ersten Teil dieser Untersuchungen gefunden wurden (l. c.). Allgemein ergibt sich hieraus der Hinweis auf eine mögliche Fehlerquelle bei der Interpretation von Versuchen über selektive Mutationsauslösung. Durch die gesicherte Inhomogenität des Mutantenspektrums zwischen Versuchen ist es zu erwarten, daß beim Vergleich von Daten, die aus nicht gleichzeitig und ohne genügend Wiederholungen durchgeführten Einzelversuchen stammen, ein Unterschied in der Häufigkeit einzelner Mutantentypen gefunden wird. Bei Vernachlässigung der starken Streuung wird diese Differenz dann als Einfluß der Bestrahlung gedeutet, während in Wirklichkeit nur Unterschiede zwischen Versuchen vorliegen.

Die hier vorgelegten Untersuchungen führen zu dem Schluß, daß die Auffassung, verschiedene Wellenlängen ionisierender Strahlen könnten selektiv auf die Mutationsrate einzelner Loci einwirken, auf Grund der gegebenen Daten über somatische Mutationen bei *Ephesia* nicht gestützt werden kann. Da aber die Verschiebung des Mutantenspektrums zwischen den Versuchen gesichert ist, bleibt es die Aufgabe, nach den Ursachen hierfür zu suchen.

### Summary

1. The dose-effect curves for the four somatic scale mutations of *Ephesia*, ES 1, 2, 3 and 4, were determined for 10 kV and 100 kV X-rays and  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays.

2. After double logarithmic transformation the relation between the dose and the mutation rate is expressed by a straight line. The regression coefficients of this line are the same within each treatment series as well as between them for all four somatic mutants.

3. In all experiments the mutation rate increased in the same proportion to the dose, although each mutant had a characteristic rate. The dose does not selectively alter the mutation rate. The mutation spectrum remains the same within each series at a particular dose.

4. The mutation spectra of the five experimental series showed differences greater than expected by random deviation. These variations in the mutation spectra cannot be attributed to the different wave-lengths of ionizing radiation here used, but rather result from unknown causes related to the fact that the experiments were not carried out concurrently.

5. This investigation showed, that for the interpretation of differences in the relative frequencies of different mutants it is not allowed to compare them with a theoretical random deviation. To avoid on overestimation of small differences, it is necessary to use as a basis for the comparison the differences between the repetitions of similar experiments.

### Literatur

- EHRENBERG, L., and N. NYBOM: Ion density and biological effectiveness of radiations. *Acta agricult. scand.* **4**, 396—418 (1954).
- FRITZ-NIGGLI, H.: Abhängigkeit der Mutationsentstehung von der Strahlenqualität (30 MeV-Elektrone, 3 MeV-Photonen und 180 kV-Photonen). *Naturwissenschaften* **45**, 117—118 (1958).
- LÖBBECKE, E. A., u. I. MÜLLER: Über die Auslösung von somatischen Mutationen bei *Ephestia kühniella* Z. durch weiche und mittelharte Röntgenstrahlen (10—100 kV). *Z. Vererb.-Lehre* **90**, 421—427 (1959).
- MATHER, K.: *Statistische Analysen in der Biologie*. Wien: Springer 1954.
- POHLEY, H. J.: Untersuchungen über differentielle Zellteilungen und somatische Mutationen am Schuppenkleid der Mehlmotte *Ephestia kühniella* Z. *Biol. Zbl.* **72**, 577—598 (1953).

Dr. ERNST-ARNOLD LÖBBECKE und Dr. ILSE MÜLLER  
Institut für Entwicklungsphysiologie der Universität Köln,  
Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 17

Aus dem Botanischen Institut der Universität zu Köln

## EIN NEUES INTERFERENZMODELL ZUR AUFSTELLUNG VON TETRADEN-KARTIERUNGSFUNKTIONEN\*

Von

H. JOUSSEN und J. KEMPER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. September 1960)

### Einleitung

Bei der Kartierung von Genen wird als Maß für den Abstand zweier gekoppelter Gene die Häufigkeit von Crossing-over zwischen den beiden Loci benutzt. Da aber im allgemeinen bei der Auswertung von Kreuzungsversuchen nicht alle Vielfach-Crossing-over zu erkennen sind, bedarf es mathematischer Korrekturformeln. Mit Hilfe dieser *Kartierungsfunktionen* wird versucht, aus der Anzahl erkennbarer Crossing-over auf die wirkliche Anzahl zu schließen. BARRATT, NEWMAYER, PERKINS und GARNJOBST (1954) stellten solche Kartierungsfunktionen auf, die zugleich die Interferenzwirkung berücksichtigten. Da uns die mathematische Konstruktion dieser Funktionen nicht gerechtfertigt erschien, versuchten wir, ein neues Interferenzmodell und damit neue Kartierungsfunktionen aufzustellen.

### Kartierungsfunktionen

Wertet man Zweifaktorkreuzungen tetradenanalytisch nach Parental-, Rekombinations- und Tetratypen aus, so ergibt die Tetratyp-Häufigkeit in erster Näherung ein Maß für die Crossing-over-Häufigkeit und damit für den Abstand.

Für die folgenden theoretischen Überlegungen wird eine Zweifaktorkreuzung vorausgesetzt, die man tetradenanalytisch auswertet. Man betrachte nur die Crossing-over-Verhältnisse in dem Bereich, der von den beiden Genloci begrenzt wird. Setzt man weiterhin voraus, daß keine Chromatideninterferenz herrscht, so läßt sich bei Annahme von genau  $r$  Crossing-over die Verteilung der Tetraden in Parental- ( $P$ ), Rekombinations- ( $R$ ) und Tetratypen ( $T$ ) bestimmen. MATHER (1935) stellte für die  $T$ -Häufigkeit  $\bar{\tau}(r)$  bei genau  $r$  Crossing-over folgende Gleichung auf:

$$\bar{\tau}(r) = \frac{2}{3} \cdot \left(1 - \left(-\frac{1}{2}\right)^r\right). \quad (1)$$

Bei Annahme fehlender Crossing-over-Interferenz wird die Wahrscheinlichkeit  $p(r)$  für das Auftreten von Tetraden mit genau  $r$  Crossing-over durch die Poisson-Verteilung wiedergegeben:

$$p(r) = \frac{(2x')^r}{r!} \cdot e^{-2x'}. \quad (2)$$

Hierin bedeutet  $2x'$  die mittlere Crossing-over-Häufigkeit pro Tetrade, d.h.  $x'$  ist die mittlere Crossing-over-Häufigkeit pro Chromatid ( $x' = \text{map units} \cdot 10^{-2}$ ).

\* Mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.



Aus Formel (1) und (2) erhalten BARRATT et al. (1954) eine Gleichung für die  $T$ -Häufigkeit  $\tau$ :

$$\tau = \sum_{r=1}^{\infty} p(r) \cdot \bar{\tau}(r). \quad (3)$$

Diese Gleichung stimmt mit der von RIZET und ENGELMANN (1949) und PAPAZIAN (1951) gefundenen Gleichung  $\tau = \frac{1}{3} \cdot (1 - e^{-3x})$  überein.

Zur Erfassung der Interferenz führen BARRATT et al. einen Interferenzfaktor  $k$  ein, der Werte von 1 (keine Interferenz) bis 0 (vollständige Interferenz) annimmt. Die einzelnen Poissonglieder werden mit wachsenden Potenzen von  $k$  multipliziert —  $p(r) \cdot k^{r-1}$ . Da jedoch die Gesamtsumme als Wahrscheinlichkeit wieder eins sein muß, multiplizieren BARRATT et al. die einzelnen Werte zur Korrektur mit einem für jedes feste  $k$  konstanten Faktor  $C$ . Für die daraus resultierende Verteilung  $\hat{p}(r)$ , die jetzt die Interferenz erfaßt, gilt:

$$\hat{p}(r) = p(r) \cdot k^{r-1} \cdot C, \quad (4)$$

$$C = \frac{S_{k=1}}{S_k} \quad \text{mit} \quad S_{k=1} = \sum_{r=1}^{\infty} p(r) \quad \text{bzw.} \quad S_k = \sum_{r=1}^{\infty} p(r) \cdot k^{r-1}.$$

Damit bestimmt sich die Tetratyp-Häufigkeit  $\tau$  bei Interferenz-Wirkung als:

$$\left. \begin{aligned} \tau &= \sum_{r=1}^{\infty} \hat{p}(r) \cdot \bar{\tau}(r) \\ &= \sum_{r=1}^{\infty} \frac{(2x')^r}{r!} \cdot e^{-2x'} \cdot \frac{2}{3} \cdot \left(1 - \left(-\frac{1}{2}\right)^r\right) \cdot k^{r-1} \cdot \frac{S_{k=1}}{S_k} \quad (\text{BARRATT 1954}). \end{aligned} \right\} \quad (5)$$

$2x'$  bedeutet jetzt nur die ursprüngliche mittlere Crossing-over-Häufigkeit pro Tetrade bei fehlender Interferenz; tritt Interferenz ein, so erhält man für die wirkliche Crossing-over-Häufigkeit  $2x$ , d. h. also für den Mittelwert der Verteilung:

$$\left. \begin{aligned} x &= \frac{1}{2} \cdot \sum_{r=1}^{\infty} r \cdot \hat{p}(r) \\ &= \frac{1}{2} \cdot \sum_{r=1}^{\infty} r \cdot \frac{(2x')^r}{r!} \cdot e^{-2x'} \cdot k^{r-1} \cdot \frac{S_{k=1}}{S_k} \quad (\text{BARRATT 1954}). \end{aligned} \right\} \quad (6)$$

Das von uns verwendete Modell unterscheidet sich von dem Barrattschen durch eine andere  $\hat{p}(r)$ -Verteilung für die Häufigkeit des Auftretens von Tetraden mit genau  $r$  Crossing-over unter Berücksichtigung einer Interferenzwirkung. Voraussetzung für dieses Modell sind fehlende Chromatiden-Interferenz sowie die Vorstellung, daß die Crossing-over zeitlich nacheinander gebildet werden. Von einer betrachteten Tetraden- bzw. Bivalent-Anzahl bilden alle Bivalente, die mindestens ein Crossing-over erhalten, zunächst nur ein Crossing-over; alle, die mindestens zwei Crossing-over erhalten, bilden dann ein zweites Crossing-over usw.; d. h. alle Bivalente mit Mehrfach-Crossing-over sind zunächst solche mit einem, zwei, drei, ... Crossing-over. Als Interferenz-Wert führe man einen Faktor  $i$  ein, der die Interferenzbeeinflussung der Bildung des jeweils nächsten Crossing-over angibt. Eine Interferenz hat demnach den Wert  $i$ , wenn für jedes  $r$  in einer Anzahl von

Bivalenten mit genau  $r$  Crossing-over die Häufigkeit für die Bildung des  $(r+1)$ -ten Crossing-over mit dem Faktor  $i$  gehemmt wird. Für diese Crossing-over-

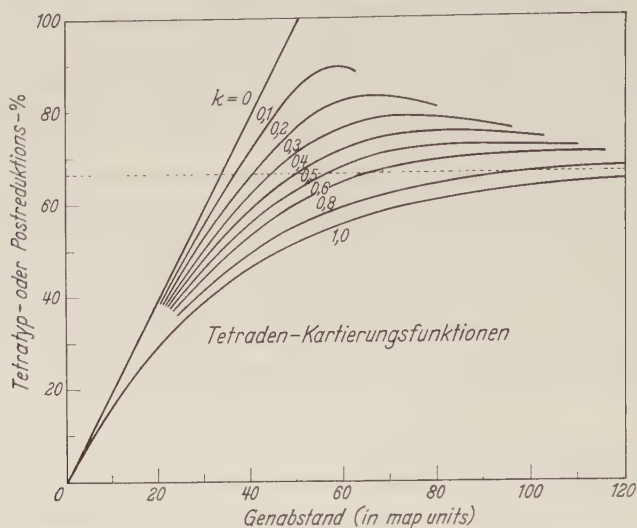


Abb. 1. Tetradtyp-Häufigkeit  $\tau$  in Abhängigkeit von  $x$  für neun verschiedene Interferenzgrade (nach BARRATT 1954)

Verteilung  $\bar{p}(r)$  ( $\bar{p}(r)$  zum Unterschied zur Barrattschen  $\hat{p}(r)$ -Verteilung) erhält man folgende Gleichung:

$$\bar{p}(r) = p(r) \cdot i^{r-1} + i^{r-1} \cdot (1-i) \cdot \sum_{v=r+1}^{\infty} p(v), \quad (4')$$

bzw. für die Tetradtyp-Häufigkeit:

$$\left. \begin{aligned} \tau(x', i) &= \sum_{r=1}^{\infty} \bar{p}(r) \cdot \bar{\tau}(r) \\ &= \frac{2}{3} \cdot \sum_{r=1}^{\infty} \left[ \frac{(2x')^r}{r!} \cdot e^{-2x'} \cdot i^{r-1} + i^{r-1} \cdot (1-i) \cdot \sum_{v=r+1}^{\infty} \frac{(2x')^v}{v!} \cdot e^{-2x'} \right] \cdot \left( 1 - \left( -\frac{1}{2} \right)^r \right) \end{aligned} \right\} \quad (5')$$

Ebenso gilt entsprechend der Gleichung (6):

$$\left. \begin{aligned} x &= \frac{1}{2} \cdot \sum_{r=1}^{\infty} r \cdot \bar{p}(r) \\ &= \frac{1}{2} \cdot \sum_{r=1}^{\infty} r \cdot \left[ \frac{(2x')^r}{r!} \cdot e^{-2x'} \cdot i^{r-1} + i^{r-1} \cdot (1-i) \cdot \sum_{v=r+1}^{\infty} \frac{(2x')^v}{v!} \cdot e^{-2x'} \right] \end{aligned} \right\} \quad (6')$$

Die Funktion  $x$  (s. Gleichung (6')) konvergiert für jedes feste  $i$  mit wachsendem  $x'$  nach einem Grenzwert. Daraus wird verständlich, daß die Kurven  $\tau(x, i)$  in Abb. 2 nur bis zu einem festen  $x$ -Wert existieren.

Analog zu Gleichung (1) läßt sich die Parental- $\bar{\pi}(r)$  bzw. Rekombinationstyp-Häufigkeit  $\bar{q}(r)$  für genau  $r$  Crossing-over angeben:

$$\left. \begin{aligned} \bar{\pi}(r) &= \bar{\varrho}(r) = \frac{1}{3} \cdot \left( \frac{1}{2} - \left( -\frac{1}{2} \right)^r \right) \quad r=2, 3, \dots \\ \text{und} \quad \bar{\pi}(0) &= 1; \quad \bar{\pi}(1) = \bar{\varrho}(0) = \bar{\varrho}(1) = 0. \end{aligned} \right\} \quad (7)$$

Entsprechend Gleichung (5) bzw. (5') erhält man die Parentaltyp-Häufigkeit  $\pi$  bzw. Rekombinationstyp-Häufigkeit  $\varrho$  insgesamt:

$$\pi(x', i) = p(0) + \sum_{r=2}^{\infty} \bar{p}(r) \cdot \bar{\pi}(r) \quad (8)$$

$$\varrho(x', i) = \sum_{r=2}^{\infty} \bar{p}(r) \cdot \bar{\pi}(r). \quad (9)$$

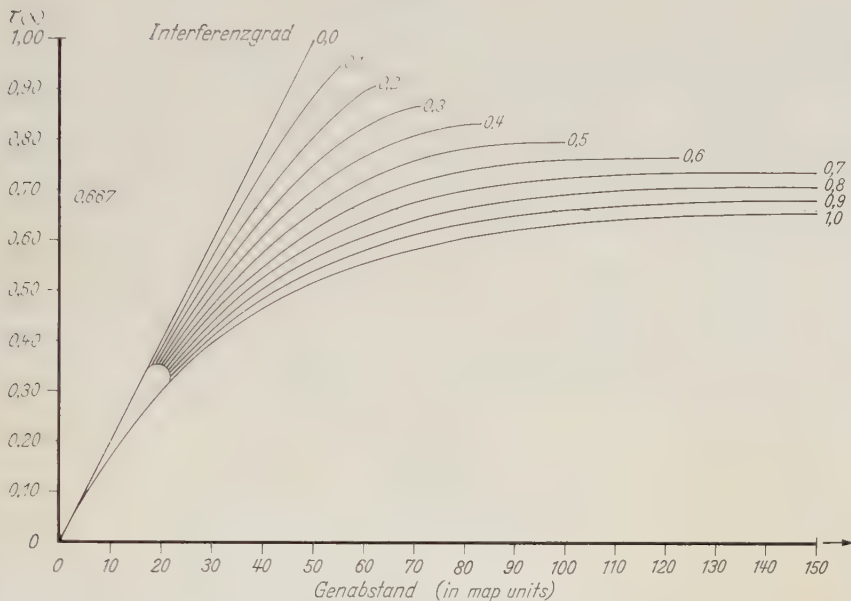


Abb. 2. Tetratyp-Häufigkeit  $\tau(x', i)$  in Abhängigkeit von der map distance  $100 x$  für elf verschiedene Interferenzgrade  $i$

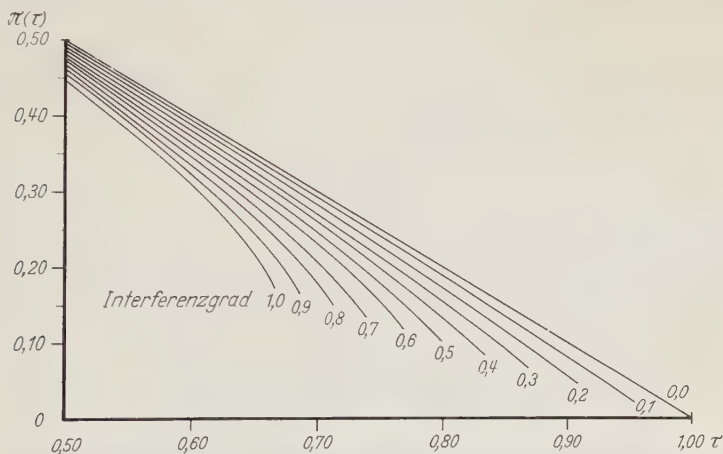


Abb. 3. Parentaltyp-Häufigkeit in Abhängigkeit von der Tetratyp-Häufigkeit. Es ist nur ein Teil der Bereiche angegeben, da im ersten Teil die Werte so dicht beieinander liegen, daß eine Unterscheidung der Kurven nur schwer möglich ist



Für jeden festen Interferenzwert  $i$  erhält man das Wertquadrupel  $x$ ,  $\pi$ ,  $\varrho$  und  $\tau$ . Da die Werte  $\pi$ ,  $\varrho$  und  $\tau$  sich zu eins ergänzen, ist die Tetradenverteilung schon durch  $\pi$  und  $\tau$  alleine charakterisiert. In Abb. 3 ist die Parentaltyp-Häufigkeit  $\pi$  in Abhängigkeit von  $\tau$  für elf verschiedene Interferenzgrade aufgetragen. Damit ist es möglich, die in einem Bereich herrschende Interferenz (im Rahmen der Fehlerbreite) durch eine Zweifaktorkreuzung zu bestimmen.

Ähnlich dieser Funktion in Abb. 3 stellte BARRATT eine Beziehung zwischen Tetratyp-Häufigkeit und Rekombinationswert auf.

### Diskussion

Die beiden Modelle unterscheiden sich in der Konstruktion der Crossing-over-Verteilung  $p(r)$  bei Interferenzwirkung. BARRATT erhält die  $\hat{p}(r)$ -Werte als Produkt der Poisson-Werte mit Potenzen von einem Interferenzwert  $k$  und einem konstanten Faktor  $C$ . Der Interferenzwert  $k$  ist biologisch nicht erfaßbar, da er auf Grund der nachträglichen Größe  $C$  nicht mehr die Interferenzbeeinflussung selbst angibt. Da uns zudem die gleichmäßige Vergrößerung der ursprünglichen Poisson-Werte nicht gerechtfertigt erschien, versuchten wir, eine neue Verteilung aufzustellen. Die von uns verwendete Verteilung ist im wesentlichen durch den Interferenzfaktor  $i$  charakterisiert.  $i$  ist eine wirkliche biologische Größe, die die Hemmung für das Entstehen eines zweiten bzw. eines weiteren Crossing-over angibt. Während die Barrattschen Funktionen Maxima aufwiesen, die bei der vorausgesetzten Interferenzwirkungsweise nicht erklärbar erschienen, zeigte sich, daß die neuen Funktionen monoton gegen einen Grenzwert konvergieren.

### Summary

In order to construct chromosome maps from tetrad data a new mapping function has been devised from a model of interference characterized by an exactly defined factor of interference  $i$ . In tetrads of a rank greater zero this factor indicates the value of inhibition of the next crossing-over. These mapping functions are of some advantage, biological as mathematical, compared with similar functions given by BARRETT et al. (1954). The mapping functions enable to evaluate interference in a two-point test cross.

Die Werte zum Zeichnen der Kurven wurden mit Hilfe einer ER56 des Institutes für Angewandte Mathematik Köln bestimmt. Hierfür, wie für die Programmierung der Gleichungen, danken wir Herrn H. HILGERS herzlich.

### Literatur

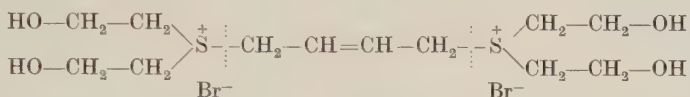
- BARRATT, R. W., D. NEWMAYER, D. D. PERKINS and L. GARNJOBST: Map construction in *Neurospora crassa*. *Advanc. Genet.* **6**, 1—93 (1954).  
 MATHER, K.: Reductional and equational separation of chromosomes in bivalents and multivalents. *J. Genet.* **30**, 53—78 (1935).  
 PAPAZIAN, H. P.: The incompatibility factors and a related gene in *Schizophyllum commune*. *Genetics* **36**, 441—459 (1951).  
 RIZET, G., et C. ENGELMANN: Contribution à l'étude génétique d'un Ascomycète tétrasporé. *Rev. Cytol. et Biol. végét.* **11**, 201—304 (1949).

HEINRICH JOUSSEN und JOST KEMPER,  
 Botanisches Institut der Universität Köln-Lindenthal, Gyrhofstr. 15—17

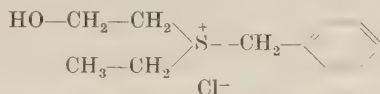
Von

RAINER BERGFELD

In Weiterführung der Mutationsversuche an *Antirrhinum majus* L. Sippe 50 (vgl. OEHLKERS 1956, BERGFELD 1958) wurden unter anderem Substanzen verwendet, von denen eine Einwirkung auf die Desoxyribosenucleinsäure (DNS) zu erwarten war. Hierzu gehörten auch zwei Substanzen, die im Chemischen Institut der hiesigen Universität unter Leitung von Herrn Prof. Dr. LÜTTRINGHAUS entwickelt wurden. Diese Substanzen besitzen die Eigenschaft an der mit . markierten Stelle auseinanderzubrechen, so daß freie Bindungen entstehen, die ihrerseits mit Gliedern der DNS-Kette reagieren können.



Tetra-(2-hydroxyäthyl)-1,4 buten-di-sulfoniumdibromid (L 6)



2-Hydroxyäthyl-äthyl-benzyl-sulfoniumchlorid (L 12)

Letztere Verbindung besitzt nach der Spaltung Lostcharakter.

Die Applikation aller Substanzen erfolgte wie bei OEHLKERS (1956) beschrieben.

Tabelle 1

	Insgesamt auf- gezogene F <sub>2</sub> NK	Nicht spaltende F <sub>2</sub> NK	Spaltende F <sub>2</sub> NK	%	Phom
Sippe 50 (Kontrolle) . . . . .	275	268	7	2,6	—
10 <sup>-6</sup> g/ml β-Indolyl-3-essigsäure . . . .	154	150	4	2,6	> 0,3
0,1% Deroxyribosenucleinsäure <sup>1</sup> . . . .	142	132	10	7,1	0,025
m/500 Methyluracil <sup>2</sup> . . . . .	46	44	2	4,4	> 0,3
m/100 Cysteinhydrochlorid . . . . .	118	109	9	7,6	0,018
m/100 Diaminhydrochlorid . . . . .	112	111	1	0,9	0,25

<sup>1</sup> Niedermolekulare DNS; geliefert von Fa. C. Roth, Karlsruhe.

<sup>2</sup> Methyluracil ist in H<sub>2</sub>O schwer, dagegen in KOH gut löslich. Es wurde eine schwach alkalische Lösung verabreicht (pH 8,0).

\* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. F. OEHLKERS danke ich für stete Förderung der Versuche. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich für finanzielle Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Die Ergebnisse von 1959 sind in Tabelle 1, diejenigen von 1960 in Tabelle 2 zusammengefaßt. Versuche, deren P-Werte kleiner als 0,05 sind gelten als gut, und kleiner als 0,01 als sehr gut gesichert. Der P-Wert des Versuches mit L 12 m/100 ist wegen zu geringer Nachkommenschaftszahl mit Vorbehalt aufzufassen (NK = Nachkommenschaften).

Tabelle 2

	Insgesamt auf- gezogene F <sub>2</sub> NK	Nicht spaltende F <sub>2</sub> NK	Spaltende F <sub>2</sub> NK	%	Phom
Sippe 50 (Kontrolle) . . . . .	189	183	6	3,2	—
0,1% Desoxyribosenucleinsäure . .	175	159	16	9,1	0,017
0,1% Desoxyribosenucleinsäure + -Indolyl-3-Essigsäure <sup>1</sup> . . . .	185	172	13	7,05	0,055
$\beta$ -Indolyl-3-Essigsäure . . . . .	99	91	8	8,1	0,085
m/100 Coffein + IES . . . . .	53	45	8	15,1	0,0015
m/100 Cysteinhydrochlorid . . . .	155	142	13	8,4	0,035
m/100 Adenin . . . . .	60	54	6	10,0	0,032
m/100 Adenin + IES . . . . .	80	76	4	5,0	> 0,3
m/100 Histidin . . . . .	81	74	7	8,7	0,055
L 6 m/100 . . . . .	13	12	1	7,7	> 0,3
L 6 m/1000 . . . . .	55	48	7	12,7	0,006
L 12 m/100 . . . . .	10	6	4	40,0	10 <sup>-6</sup>
L 12 m/1000 . . . . .	105	95	10	9,5	0,018

<sup>1</sup> Bei den Substanzen mit IES-Zugabe wurde so verfahren, daß die Substanz in einer IES-Lösung der Konzentration 10<sup>-6</sup> g/ml gelöst wurde.

Eine Erklärung der möglichen mutagenen Wirkungsweise der einzelnen Substanzen soll hier nicht gegeben werden. Laufende Versuche müssen noch nähere Aufschlüsse erbringen.

Hingewiesen sei nur auf die Wirkung von  $\beta$ -Indolyl-3-essigsäure (IES). IES wurde zusätzlich zu einigen Substanzen appliziert, da sie in bestimmten Konzentrationen (vgl. u. a. OCHS und POHL 1959) die Permeabilität der Plasmagrenzflächen erhöhen kann. Es wäre also zu erwarten gewesen, daß durch diese IES-Wirkung mehr von der mutagenen Substanz in die Pollenmutterzellen gelangt und so ein höherer Mutationseffekt erzielt würde. Bei der angewandten Konzentration trat aber das Gegenteil ein. Sowohl bei den Versuchen mit DNS, wie auch bei denen mit Adenin ist der Mutationsprozentsatz bei gleichzeitiger IES-Gabe gegenüber den Versuchen ohne IES-Zusatz z.T. stark herabgesetzt. Ähnlich verhielt es sich auch bei Coffein. Coffein (m/100) allein wirkt toxisch, die Pflanzen starben bald von der Infloreszenz her ab. Dagegen konnten Pflanzen unter gleichen Bedingungen, denen zusätzlich noch IES verabreicht wurde, bis zur Anthese gezogen werden, obgleich auch bei diesen Pflanzen eine, wenn auch nicht so starke, toxische Wirkung zu beobachten war. Ebenso verliefen auch weitere Versuchsansätze mit Coffein in den Jahren 1959 und 1960. Die Möglichkeit ist nicht ausgeschlossen, daß IES einen hemmenden Einfluß auf den DNS-Stoffwechsel besitzt, d.h. die Einbau- bzw. Austauschaktivität herabgesetzt (vgl. HESS 1960). Der direkte Nachweis steht bei unseren Versuchen noch aus.



### Literatur

- BERGFELD, R.: Mutationsauslösung durch Chemikalien bei *Antirrhinum majus* L. Z. Vererb.-Lehre **89**, 131—142 (1958).
- HESS, D.: Die Bedeutung der Ribosenucleinsäure für die Blühinduktion der Pflanzen. Habil.-Schr. der Univ. Freiburg i. Br. 1960.
- OCHS, G., u. R. POHL: Wuchsstoff (IES) und die Zellulosesynthese der *Avena*-Koleoptile. Z. Bot. **47**, 505—520 (1959).
- OEHLKERS, FR.: Die Auslösung von Mutationen durch Chemikalien bei *Antirrhinum majus* L. Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 584—589 (1956).

Dr. RAINER BERGFELD,  
Botanisches Institut der Universität Freiburg i. Br., Schänzlestr. 9—11

Aus dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Hochschule für Bodenkultur  
in Wien und der Zuchtstation der Probstdorfer Saatzucht, Nieder-Österreich

## BEOBSACHTUNGEN ÜBER ALBINOTISCHE UND VIRESZENTE CHLOROPHYLLABERRANTEN UND DEREN NACHKOMMEN BEI GERSTE (*HORDEUM VULGARE* CONVAR. *DISTICHON*\*)

Von

HERMANN HÄNSEL

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. Oktober 1960)

### A. Einleitung

Der erste Anlaß für die eingehenderen Beobachtungen über spontan auftretende Chlorophylldefekte und vireszente<sup>1</sup> Pflanzen bei Gerste war das abnorm häufige Vorkommen albinotischer Keimpflanzen im Frühjahr 1955 von 0,2—0,4% weißer bis weißlich-gelber Pflanzen dieser autogamen Getreideart. Die zum Zeitpunkt der Auszählung weißlichen Pflanzen waren phänotypisch von *albina*- oder *alboxantha*-Mutanten nicht zu unterscheiden und starben im Zwei- bis Vierblattstadium ab. Auch der Großteil der 1956 und 1957 mit einer bisher nicht beschriebenen Häufigkeit aufgetretenen ergrünenden (vireszenten) Chlorophyllaberranten war bis zum Zwei- bis Dreiblattstadium von albinotischen Mutanten nicht unterscheidbar.

Es erschien nun einer Überprüfung wert, ob es sich in diesen Fällen um ein häufigeres Vorkommen bestimmter Chlorophyllmutanten, um nur unter sehr spezifischen Umweltbedingungen sichtbar werdende erbliche, oder um nicht erbliche Chlorophylldefekte handelte. Dies insbesondere im Hinblick auf die Auszählung spontaner oder induzierter Mutanten unter Freilandbedingungen.

### B. Klassifizierung der Chlorophyllaberranten

Alle phänotypisch deutlich chlorophylldefekten Pflanzen werden im folgenden, unabhängig von Erblichkeit und Ursache des Defektes, Chlorophyllaberranten genannt.

Für die verschiedenen Färbungstypen von Chlorophyllmutanten wurde von HALLQUIST (1924) und GUSTAFSSON (1940) ein nun üblich gewordenes Klassifizierungsschema vorgeschlagen, welches HOLM (1945) (nach STADLER und SMITH) nochmals illustrierte. Diese Art der Bezeichnung soll für nachgewiesene Mutanten reserviert bleiben und wird in der Liste der hier gefundenen phänotypischen Färbungsvarianten bei der etwa entsprechenden Farbgruppe in Klammern angeführt. Dem Beobachtungszeitpunkt gemäß gilt die Klassifizierung für Keimpflanzen im Zwei- bis Vierblattstadium. Es kamen verschiedene Übergänge zwischen

\* Die vorliegende Arbeit wurde durch den „Theodor-Körner-Stiftungsfond zur Förderung von Wissenschaft und Kunst“ (Wien) unterstützt.

<sup>1</sup> Die im folgenden verwendeten Ausdrücke vireszent bzw. Vireszenz bedeuten hier ergrünend bzw. die Eigenschaft des Ergrünens von ursprünglich weißen, weißlich gelben oder weißlich hellgrünen Pflanzen, unabhängig davon ob der Charakter des Ergrünens erblich oder nicht erblich ist. Vireszent hat hier somit nicht dieselbe Bedeutung wie der seit GUSTAFSSON (1940) übliche Ausdruck *virescens*, worauf später noch eingegangen werden soll. Albinotisch werden hier alle Keimpflanzen genannt, bei welchen weiß oder ein weißlicher Farbton vorherrscht.

den genannten Farbvarianten vor, und dieselbe Keimpflanze konnte ihre Färbung im Verlaufe ihrer Entwicklung ändern, so daß ihre Einreihung auch von ihrem zum Teil zufallsbedingten Entwicklungszustand am Tage der Bonitierung abhing.

1. Die Keimpflanze ist einheitlich oder ziemlich einheitlich gefärbt.

1. Weiß (*albina*): Keimpflanzen weiß, Blattspitzen manchmal etwas gelblich, bei kühler Witterung zum Teil rötlich-violett.

2. Gelb (*xantha*): Keimpflanzen gelb, gelblich bis einheitlich gelblich-weiß.

3. Hellgrün (*viridis*): Keimpflanzen hellgrün, grüngelblich bis blaßgrün.

11. Die Keimpflanze oder einzelne Blätter derselben sind deutlich uneinheitlich gefärbt.

4. Weiß-gelb (*albexantha*, *xanthalba*): Blattspitzen weiß, bis auf deutliche Gelbfärbung an der Basis und/oder Spitze der meisten Blätter.

5. Weiß-grün (*alboviridis*, *viridionalba*): Blattspitzen weiß, bis auf grünliche Färbung der Basis und/oder Spitze der meisten Blätter. Es kommt vor, daß an derselben Pflanze bei einem Blatt die Spitze und bei einem anderen die Basis grünlich ist.

6. Gelb-grün (*xanthoviridis*): Blattspitzen uneinheitlich gelb und grünlich.

7. Quergestreift (*tigrina*): Blattspitzen mit abwechselnd grünen und gelblichen Bändern. Die einzige derartige beobachtete Form war vireszent und erblich.

8. Längsgestreift (*striata*): Blattspitzen hellgrün oder gelblich längsgestreift. Längsstreifung tritt häufig bei weiß-grünen oder weiß-gelben Formen in den Zonen der Farbübergänge auf. Zwei fast vollständig gestreifte Keimpflanzen wurden nicht weiter verfolgt.

### C. Vireszente Keimpflanzen

Für die hier bei Gerste beobachtete Art des Ergrünerens ist es charakteristisch, daß die Blätter der Keimpflanzen bereits bei ihrem Erscheinen den Chlorophylldefekt am stärksten zeigen und in der weiteren Entwicklung erstmalig ergrünen und *nicht* etwa nach einer erst in späteren Stadien einsetzenden Chlorose *wiedere*grünen. Der zuletzt genannte Fall kann bei Getreide nämlich als Folge von vorübergehenden, ernährungsbedingten Chlorosen eintreten, welche meistens erst nach Verbrauch der Nährstoffreserven des Endosperms sichtbar werden. Im Gegensatz zu vireszenten Typen sind die sog. *lutescens*-Typen als Keimpflanzen normal grün und zeigen mit zunehmendem Alter eine Abnahme des Chlorophyllgehaltes.

Bei den des öfteren bei Winterroggen und Winterweizen im Frühjahr sichtbaren längsgestreiften Pflanzen ist es nicht erwiesen, ob sie sich aus gestreiften bzw. albinotischen Keimpflanzen entwickelt haben oder aus normalgrünen. Nach ZIMMERMANN (1908) (nach GASSNER 1915) wurden die gestreiften Roggenpflanzen erstmalig nach einem jähen Temperaturwechsel von  $-1,3^{\circ}\text{C}$  auf  $13,1^{\circ}\text{C}$  beobachtet. Sie ergrünten allmählich, hatten jedoch keine gestreiften Nachkommen. Stärker albinotische Pflanzen starben ab.

Verschiedene erbliche Formen der Vireszenz wurden bei Keimpflanzen von Getreidearten mehrfach vorgefunden: so bei Gerste MIYAZAWA (1921), HALLQUIST (1923, 1924), COLLINS (1927), STADLER (1930), ROBERTSON u. COLEMAN (1942), IMMER u. HENDERSON (1943), GUSTAFSSON (1947), HOLM (1954) und GAUL (persönliche Mitteilung), bei Hafer von GASSNER (1915) und AKERMANN (1922), bei *Triticum monococcum* von FULL (1957), bei Roggen von BREWBAKER (1926) und DUMON (1954, 1959) und bei Mais seit EMERSON (1912) von zahlreichen Autoren (s. DE HAAN 1933). Die Ausprägung des erblichen Chlorophylldefektes selbst, als auch die Zunahme des Chlorophyllgehaltes während des Ergrünerens war zum Teil stark abhängig von Licht (AKERMANN 1922; SIRKS 1929) und Temperatur (GASSNER 1915; HALLQUIST 1923; COLLINS 1927; HOLM 1954). Dies weist auf die noch später zu besprechenden Schwierigkeiten bei der Beurteilung der Erbllichkeit derartiger Chlorophylldefekte hin.

Als vireszent werden im folgenden nur Pflanzen bezeichnet, deren zumindest ersten 2 Blätter schon bei ihrem Erscheinen albinotisch sind und bei denen später zumindest das erste Blatt deutlich stärker ergrünt ist als die folgenden. Es können daher alle acht oben genannten Farbvarianten Vireszenz zeigen oder nicht, je nachdem ob ein Fortschreiten des Ergrünerens mit dem Älterwerden der chlorophylldefekten Blätter erkennbar ist. Dies ist nicht immer bei weiß-grünen oder gelbgrünen Keimpflanzen der Fall, welche zum Teil im Laufe des Wachstums keine Intensivierung und Ausbreitung der grünen Partien aufweisen und bald absterben. Vireszenz hat somit hier eine etwas andere Bedeutung, als in dem üblichen Schema für Chlorophyllmutanten.



Das Ergrünen setzte bei allen kontrollierten Pflanzen, bei dem ältesten, also ersten Blatt ein. Die weiteren 2—4 albinotischen Blätter ergrünt in der Reihenfolge ihres Erscheinens und fast immer erst dann, wenn ihre Ligula sichtbar geworden war. Erst spätere Blätter waren bereits bei ihrem Erscheinen grünlich und schließlich normal grün. Es kam vielfach vor, daß die ersten beiden Blätter abstarben, bevor sie ganz ergrünt waren, die späteren Blätter jedoch ergrünt und die Pflanze Samen produzierte. Das einzelne Blatt ergrünte von der Spitze und/oder von der Basis her, wobei die Blattränder häufig länger albinotisch blieben als das Blattinnere. Das Ergrünen konnte an verschiedenen Blättern derselben Pflanze verschiedene Ausgangszonen haben.

Der erste oder die beiden ersten Bestockungstrieb waren in den meisten Fällen bis zum zweiten oder dritten Blatt albinotisch, obwohl das Ergrünen einzelner Blattspreiten des Haupttriebes bereits im Gange oder fast vollendet war (Abb. 3, Pflanzen-Nr. 1, 2, 3, 5, 6). In den Zonen des Farbüberganges trat in mehreren Fällen eine deutliche Längsstreifung auf, wobei das zwischen den Gefäßbündeln liegende Gewebe länger hell blieb.

Die Beurteilung des Farbtypus und der Vireszenz hing somit sehr vom Wachstumszustand ab, so daß im Extremfall eine Keimpflanze im Zweiblattstadium als weiß, im Dreiblattstadium als weiß-gelb und im Fünfbblattstadium als weiß-gelb-vireszent beurteilt werden konnte. Wie erwähnt, befanden sich die Keimpflanzen am Tage der Beurteilung zum Teil in verschiedenen Blattstadien. Auffallend war, daß bei den meisten vireszenten Pflanzen nicht nur das Chlorophyll, sondern auch die gelben Blattfarbstoffe verzögert ausgebildet wurden (Tabelle 3 und 4).

In einer Studie über die morphologischen Unterschiede der Plastiden in weißen und ergrüntem Teilen desselben vireszenten Maisblattes fand SCHWARTZ (1949), daß der Chlorophyllgehalt im allgemeinen, jedoch nicht immer, mit der Größe der Plastiden korreliert war.

#### D. Ergebnisse

Die 3 Beobachtungsfolgen, die Art der Nachkommenschaftsprüfungen und die wesentlichen Ergebnisse sind in Abb. 1 schematisch dargestellt.

Die Auszählungen im Freiland wurden nur an mit der Hand einzelkornweise angesäten Parzellen vorgenommen, wobei der Standraum der Einzelpflanze  $5 \times 12,5$  cm oder  $2\frac{1}{2} \times 12,5$  cm betrug. Die Gesamtzahl der Pflanzen wurde nach Testzählungen an verschiedenen Stellen der Versuchspartellen abgeschätzt. Bis auf die in den Standardpartellen angesäten Sorten, welche aus jeweils mehreren Linien zusammengesetzt waren, war jede der beurteilten Röntgen- und Kreuzungslinien die Nachkommenschaft einer  $X_1$ - bzw.  $F_1$ -Pflanze in der 3.—7. Selbststengeneration.

##### a) Letale Chlorophyllaberranten 1955

Im Frühjahr 1955 waren die Bedingungen für das Auflaufen der Gerste, vor allem infolge niedriger Temperaturen (Tabelle 6, Abb. 2) ungünstig. Bei der Auszählung albinotischer Pflanzen am 8. und 9. Mai hatten die Keimpflanzen erst 2—3 Blätter entwickelt. Ausgezählt wurden einerseits weiße und weiß-gelbe Chlorophyllaberranten und andererseits fast vollständig oder vollständig bräunlich vergilbte Keimpflanzen. Bei diesen ist es sehr wahrscheinlich, daß sie ebenfalls ursprünglich albinotisch waren, wie aus den beobachteten Welkestadien weißer und weißgelber Keimpflanzen geschlossen werden darf.

Die Häufigkeit der Chlorophyllaberranten betrug bei insgesamt etwa 187 200 Pflanzen 0,2% und bei Hinzuzählung der bereits vergilbten Individuen 0,43%. Die chlorophylldefekten Pflanzen starben im Zwei- bis Vierblattstadium ab, und es ist nach den Erfahrungen der folgenden Jahre nicht ausgeschlossen, daß ein Teil von ihnen unter günstigeren Bedingungen vireszent geworden wäre.

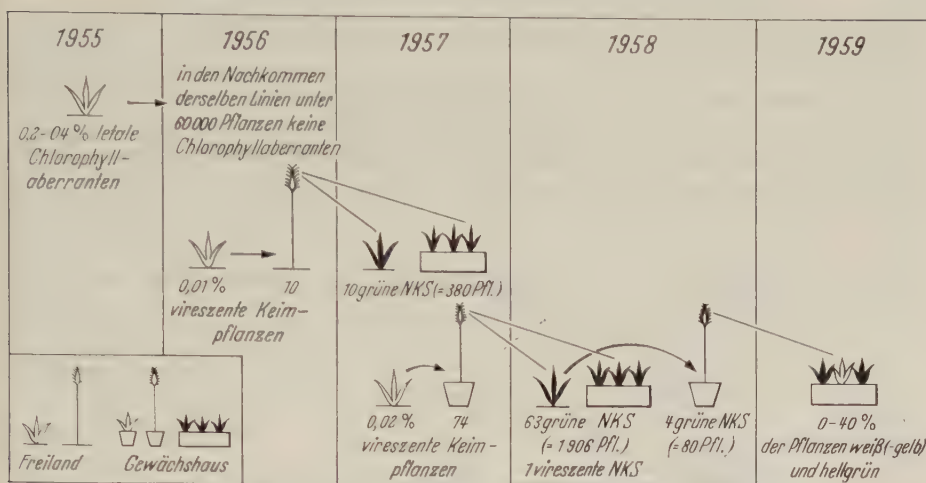


Abb. 1. Schematische Darstellung der Versuchsanordnung und der Ergebnisse

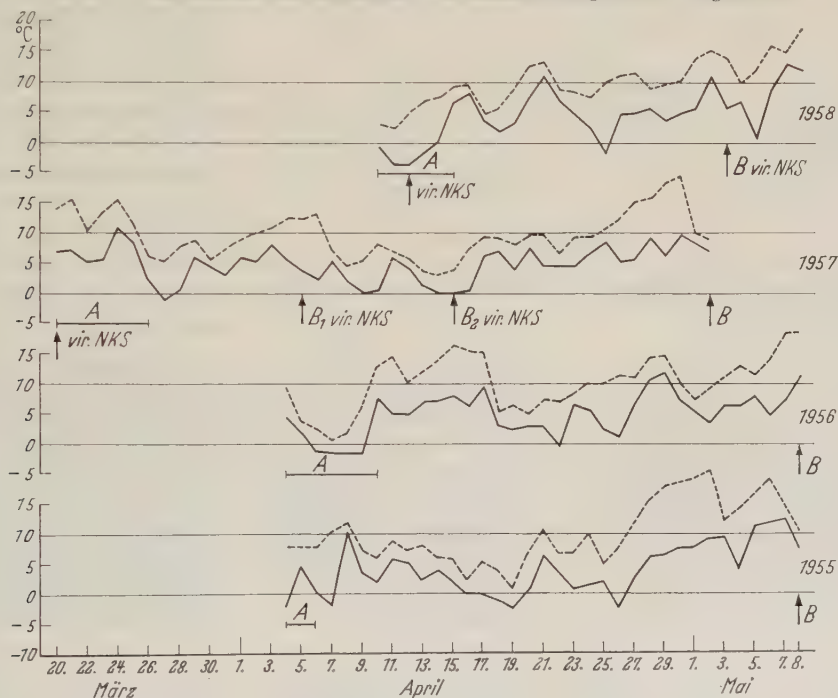


Abb. 2. Temperatur-Tagesmittel (—) und abs. Minima (---) 1955-1958 zwischen den Terminen der Aussaat (A) und Beurteilung (B) der in die Beobachtung einbezogenen Sommergersten (vir. NKS. = Nachkommenschaften von im Vorjahr vireszenten Pflanzen). Temperaturen von Groß-Enzersdorf, 4 1/2 km vom Versuchsort

Wie Tabelle 1 zeigt, war die Häufigkeit der Chlorophyllaberranten bei einer als Standard benützten, seit etwa 20 Jahren in Erhaltungszucht stehenden Sorte (Vollkorn) höher, als bei X<sub>5</sub>-Linien, welche nach Röntgenbestrahlung derselben Sorte selektiert worden waren und als bei Kreuzungslinien verschiedener Abstammung. Es dürften daher weder Bestrahlungsnachwirkungen noch eine

erhöhte Heterozygotie eine Steigerung der Frequenz albinotischer Pflanzen in diesem Jahre verursacht haben.

Die Samen von 34 Linien, welche bei insgesamt 32700 Pflanzen 93 albino-tische Aberranten (= 0,28 %) aufgewiesen hatten, wurden 1956, und zwar je Linie mit 1764 Samen, angesät, das sind zusammen etwa 60000 Samen. Unter den daraus erwachsenen Keimpflanzen wurde keine einzige Chlorophyllaberrante gefunden. Hätte es sich bei den 0,2—0,4 % albinotischen Pflanzen des Vorjahres

Tabelle 1. Chlorophyllaberranten bei Sommergersten-Linien in den Jahren 1955, 1956 und 1957 (ausgezählt an handgelegten Freilandparzellen)

	Genetisch verschiedene Linien		Pflanzenzahl		
	gesamt	mit Chlorophyllaberranten	gesamt	Chlorophyllaberranten	Aber-ranten %
1955					
X <sub>5</sub> -Linien . . .	295	89	118300	188	0,16
Kreuzungslinien	106	37	54800	117	0,21
„Vollkorn“ . .	—	—	9500	40	0,42
„Barin“ . . . .	—	—	4600	9	0,20
Summe			187200	354	0,20
1956					
X <sub>6</sub> -Linien . . .	88	13	63500	9	0,014
Kreuzungslinien	1671	14	213500	31	0,015
„Vollkorn“ . .	—	—	89300	2	0,002
„Barin“ . . . .	—	—	3800	0	0
Summe			370100	42	0,011
1957					
X <sub>7</sub> -Linien . .	26	9	32760	10	0,031
Kreuzungslinien	756	38	413700	72	0,018
„Vollkorn“ . .	—	—	53760	13	0,024
„Herta“ . . .	—	—	81900	14	0,017
Summe			582120	110	0,019

b) Vireszente Chlorophyllaberranten 1956 und 1957 und deren Nachkommen

1956 waren die Auflaufbedingungen für Gerste ziemlich günstig und es wurden unter etwa 370000 Keimpflanzen 42 Chlorophyllaberranten gefunden. Nur vier davon waren nicht vireszent und gelb, die übrigen zeigten zu einem der beiden Beobachtungstermine (5. und 8. Mai) die oben genannten Anzeichen von Vireszenz (Tabelle 1 und 3). Eine zur Kontrolle der Farbausprägung angesäte X<sub>6</sub>-Linie (X-52) von welcher bekannt war, daß sie für ein *albina*-Gen spaltete, ließ im Freiland 5,9% und im Gewächshaus 7,8% rein weiße, nicht ergrünende Pflanzen erkennen (Tabelle 7). (Diese Linie wurde auch in den folgenden Jahren angesät und nicht in die Berechnung der Aberrantenfrequenz einbezogen.)

Die Häufigkeit von Chlorophyllaberranten betrug in diesem Jahre etwa  $\frac{1}{20}$  bis  $\frac{1}{40}$  von der im Vorjahre beobachteten, und während im Vorjahr alle Aberranten letal waren, waren sie 1956 fast alle vireszent. Außerdem war ihre durch-

um homozygot rezessive *albina* oder *alboxantha* Mutanten im üblichen Sinne gehandelt, so wären 1956 in demselben Material 0,1—0,2 % Mutanten desselben Typus zu erwarten gewesen. Es bleibt allerdings die Frage offen, warum 1955 gerade diese 354, einzeln und ziemlich gleichmäßig über den Bestand verteilten Keimpflanzen weiß und die übrigen 180000 grün aufgelaufen waren, und ob nur Nuancen der Umweltbedingungen oder auch erbliche, genetische oder plasmatische Differenzen, welche sich nur unter bestimmten Umweltbedingungen phänotypisch manifestieren, die Chlorophylldefekte verursachten.



schnittliche Frequenz bei den X<sub>6</sub>-Linien und Kreuzungslinien diesmal höher als bei den als Standard verwendeten Sorten.

Zehn vireszente Pflanzen, bei welchen zumindest die ersten 4 Blätter und der erste Bestockungstrieb anfänglich weiß waren, wurden im Felde gekennzeich- net, später aufgebunden und ihre Samen pflanzenweise geerntet. Die 10 Nachkommen- schaften wurden 1957 sowohl im Freiland, als auch im Gewächshaus herangezogen.

Tabelle 2. *Vireszente Pflanzen (1956) und deren Nachkommen (1957)*

Linien Nr/1956	1956			1957				
	Pflanzenzahl		Vires- zente Pflanzen  %	Nachkommen vireszenter Pflanzen				
				Zahl der Nach- kommen- schaften	Pflanzenzahl		vireszente Keimpflanzen	
	gesamt	vires- zent			Freiland	Ge- wächs- haus	Freiland	Ge- wächs- haus
X-Linien								
4248	760	1	0.13	1	19	20	0	0
7155	253	1	0.39	1	18	20	0	0
Kreuzungslinien								
1153	57	7	12.28	4	74	79	0	0
2040	1650	1	0.06	1	20	20	0	0
4191	760	1	0.13	1	19	19	0	0
4193	760	1	0.13	1	17	20	0	0
4194	760	4	0.53	1	17	18	0	0

Wie Tabelle 2 zeigt, bestanden alle 10 Nachkommenschaften unter beiden Bedingungen ausschließlich aus normal grünen Pflanzen. Dies war um so auf- fallender, als 1957 insgesamt etwa doppelt so viele vireszente Pflanzen gefunden wurden als 1956.

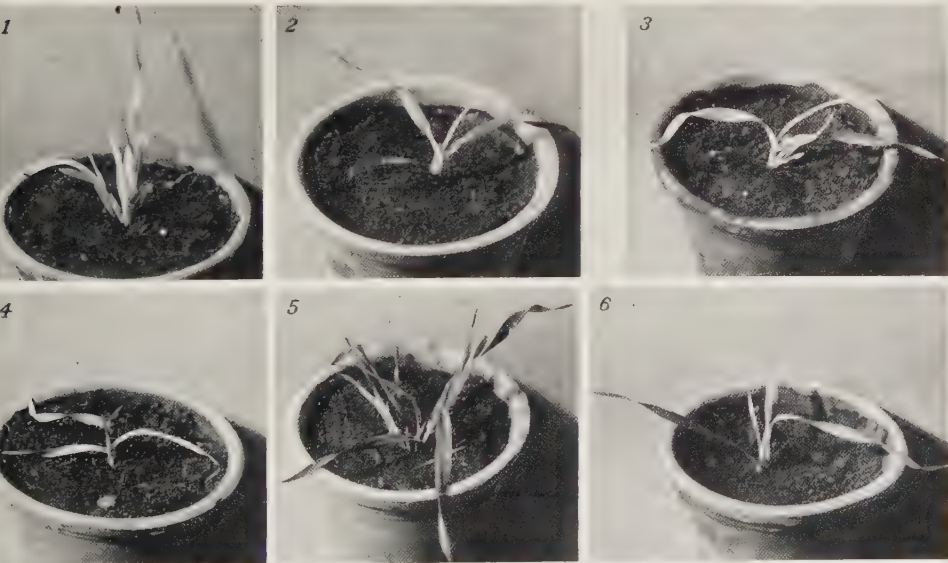


Abb. 3. Vireszente, aus dem Freiland in Töpfe verpflanzte Gerstenpflanzen (1957). Die Pflanzen 1 und 4 starben ab, die Pflanzen 2, 3, 5 und 6 ergrüntem vollständig und hatten 1958 normal grüne Nach- kommen. In der zweiten Selbstungsgeneration (1959) zeigten die Nachkommen der Pflanze 3 im kühlen Gewächshaus 6 % albinotisch-letale Keimpflanzen

Das Jahr 1957 glich im wesentlichen dem Vorjahr. Die Aberrantenfrequenz war zwar etwa doppelt so groß wie 1956, erreichte aber bei weitem nicht die Höhe von 1955. Wie 1956 traten fast ausschließlich und zwar 100 vireszente Aberranten auf, von welchen die weiß-vireszenten Typen, bei welchen auch die gelben Blattfarbstoffe verzögert ausgebildet wurden, am häufigsten waren (Tabelle 3). Die vier hellgrünen und nicht vireszenten Keimpflanzen wurden in einer einzelnen Kreuzungslinie, eine jede der fünf nicht vireszenten, weißen Pflanzen in verschiedenen Kreuzungslinien gefunden. In diesem Jahr zeigten die Röntgenlinien und Kreuzungslinien gegenüber den Sorten keine erhöhte Aberrantenfrequenz, so daß die 3jährigen Ergebnisse keinen Anlaß zur Annahme geben, daß Bestrahlungsnachwirkungen, abgesehen von den regelmäßig in der  $X_2$ -Generation auftretenden Chlorophyllmutanten, oder Heterozygotie im allgemeinen das Auftreten von Chlorophyllaberranten förderten.

Tabelle 3. Häufigkeit verschiedener, vor allem vireszenter Chlorophyllaberranten im Freiland 1956 und 1957<sup>1</sup>

	Weiß	Gelb	Hellgrün	Vireszent								Chlorophyllaberranten	
				weiß	gelb	hellgrün	weißgelb	weißgrün	gelbgrün	längsgestreift	quergestreift	gesamt	vireszent
1956 Summe		6		33	3							44	36
1957 X-Linien .				3	1	2	2	2				10	10
Kreuzungslinien . . .	4		4	25	8	8	8	5	6	3	1	72	64
„Vollkorn“				6		1	2	4				13	13
„Herta“	1			5	3	1	1	3				14	13
1957 Summe	5		4	39	11	12	13	14	6	3	1	109	100

<sup>1</sup> Die Keimpflanzen hatten zur Zeit der Beurteilung 3—5 Blätter.

Einige Linien zeigten 1957 eine auffallend hohe Häufigkeit vireszenter Individuen, welche bei 3 Kreuzungslinien über 1% betrug (Tabelle 4). (Die vireszenten Pflanzen innerhalb solcher Linien waren nicht einheitlich gefärbt, was, wie erwähnt, unter anderem mit den etwas verschiedenen Wachstumsstadien der einzelnen Pflanzen zusammenhängen könnte.) Von diesen und anderen Linien wurden insgesamt 73 vireszente Keimpflanzen, bei welchen zumindest die drei ersten Blätter albinotisch waren, und eine quergestreifte, vitale Form in Tontöpfe verpflanzt und im Gewächshaus herangezogen. 63 von diesen, darunter auch die Pflanzen Nr. 3, 4, 5 und 6 auf Abb. 3, brachten Samen zur Reife, welche 1958 getrennt nach Nachkommenschaften sowohl im Freiland wie im Gewächshaus angesät wurden. Auch diesmal waren die Nachkommen der im Vorjahr vireszenten Pflanzen normal grün (insgesamt 1906 Pflanzen). Eine Ausnahme machten die Nachkommen der quergestreiften Form, bei welcher von 28 Pflanzen 26 wie die Mutterpflanze quergestreift und vital waren. Es handelte sich demnach um eine vitale *tigrina*-Mutante. Fünf der normal grünen Nachkommenschaften stammten von vireszenten Pflanzen ab, welche in der für *albina* spaltenden Röntgenlinie X-52 aufgetreten waren. Die 1957 in dieser X-Linie vorgekommenen

Tabelle 4. *Vireszente Pflanzen (1957) und deren Nachkommen (1958)*

Linien Nr.	1957								1958						
	Vireszent							Pflanzenzahl		Vires- zent		Nachkommen von vireszenten Pflanzen			
	weiß	gelb	hell- grün	weiß- gelb	weiß- grün	gelb- grün	quer- ge- streift	Pflanzenzahl		%	Zahl der Nach- kommen- schaften	Pflanzenzahl		Vireszente Keimpflanzen	
								gesamt	vires- zent			Freiland	Gewächshaus	Freiland	Gewächshaus
X-Linien	6		1	2	1			1260	6	0,5	5	102	46	0	0
X-52	1							2520	5	0,25	3	62	28	0	0
X-4156	2				4			420	6	1,4	3	63	30	0	0
Kreuzungslinien	1							420	1	0,25	1	19	10	0	0
3049		1						420	1	0,25	1	18	9	0	0
3301			1					420	1	0,25	1	20	10	0	0
3489								420	1	0,25	1	17	9	15	9
3494							1	420	1	0,25	1	182	88	0	0
3523		2	1	2		2		420	9	2,15	9	60	27	0	0
3572	2	1						420	3	0,7	3	20	10	0	0
3599	2	1			1			1260	1	0,1	1	159	78	0	0
4056	8							1260	8	0,6	8	246	118	0	0
4164	8	1	2	1		2		1260	14	1,1	12	17	9	0	0
4165				1				1260	2	0,2	1	20	10	0	0
4166	1			1	1			1260	1	0,1	1	21	8	0	0
4167				1	1			1260	1	0,1	1	18	10	0	0
4194					1			1260	1	0,1	1				
4219								1260	1						
Sorten:															
„Vollkorn“	4		1	2	4				11		8	162	78	0	0
„Herta“	5	3			2				10		5	101	45	0	0



vireszenten Pflanzen waren demnach nicht modifizierte *albina*-Typen, sondern eher modifizierte normale Pflanzen gewesen.

Um das erbliche Verhalten einiger im Jahre 1957 vireszenten Individuen, deren Nachkommen 1958 keine Vireszenz gezeigt hatten, nochmals zu überprüfen, wurden 1958 vier dieser normal grün erscheinenden Nachkommenschaften zu je 20 Pflanzen vom Freiland in Töpfe verpflanzt und im Gewächshaus herangezogen. Die verpflanzten Nachkommenschaften gingen auf vireszente Pflanzen zurück, welche 1957 in Linien mit deutlich erhöhten Frequenzen von 0,7; 2,15; 0,6 und

Tabelle 5. *Zweite Selbstungsgeneration vireszenter Pflanzen, deren erste Selbstungsgeneration normal grün war*

Nr. 1957/1958	Keimpflanzen 1959			Chloro- phyll- aberran- ten %
	nor- mal- grün	albino- tisch	hell- grün	
3599/1/10	8	—	—	10,7
12	3	—	—	
13	4	—	—	
18	1	—	—	
20	9	3	—	
3572/1/1	5	—	—	40,0
2	3	2	—	
11	11	3	1	
12	5	3	—	
15	7	2	3	
17	6	3	4	
18	8	7	2	
4164/1/5	21	—	—	0
6	6	—	—	
14	4	—	—	
20	15	—	—	
4165/1/1	14	1	—	6,0
3	3	—	—	
7	8	1	—	
12	12	1	—	

1,1 % vireszenten Typen aufgetreten waren und daher eher eine erbliche Grundlage der Vireszenz vermuten ließen. Unter den sehr trockenen und heißen Anzuchtbedingungen im Glashaus entwickelten nur etwa  $\frac{1}{4}$  der getopften Pflanzen wenige Samen. Diese wurden Mitte Januar des nächsten Jahres (1959) als Einzelpflanzen-Nachkommenschaften im kühlen Gewächshaus bei 3—10° C angekeimt und im Zweiblattstadium beurteilt. Die 4 Linien zeigten unter diesen Bedingungen 10,7; 40; 0 und 6% chlorophylldefekte Keimpflanzen (Tabelle 5). Die unter denselben Bedingungen herangezogenen Kontrolle-Nachkommenschaften hatten nur normal grüne (658) Pflanzen. Der höchste Prozentsatz albinotischer Pflanzen (40%) trat in der zweiten Selbstungsgeneration einer vireszenten Pflanze der Linie 3572 auf, welche 1957 mit 2,15% die höchste Frequenz vireszenter Keimpflanzen erreicht hatte. Bei dieser Nachkommenschaft konnten

2 Arten des Chlorophylldefektes unterschieden werden, nämlich fast rein weiße Keimpflanzen mit etwas gelblichen Blattspitzen und fast einheitlich sehr hellgrüne Keimpflanzen. Keine dieser beiden Formen zeigte unter gegebenen Bedingungen Anzeichen von Vireszenz, so daß alle chlorophylldefekten Pflanzen bald abstarben.

Diese Ergebnisse weisen auf eine Erbanlage für Chlorophyllbildung hin, welche je nach den Umweltbedingungen der Samenreife und/oder der Keimung normalgrüne (1958), vireszente, vitale (1957) oder albinotische, letale (1959) Pflanzen bedingen kann. Über die Art der Vererbung kann aus den bisherigen Beobachtungen nichts Bestimmtes abgeleitet werden. Auch ist es sicherlich nicht gerechtfertigt, aus dem Verhalten der vier eingehender untersuchten Linien auf die Ursachen der Vireszenz bei den zahlreichen anderen beobachteten vireszenten Pflanzen zu schließen.

### c) Temperaturverlauf und Häufigkeit von Chlorophyllaberranten

Im Jahre 1955 wurden keine vireszenten Typen beobachtet, jedoch die Frequenz letaler, albinotischer Chlorophyllaberranten war mit 0,2—0,4 % abnorm

hoch. In den Jahren 1956 und 1957 hingegen war die Frequenz der Chlorophyllaberranten mit 0,01 bzw. 0,02 % etwa normal, jedoch fast alle aberranten Individuen gehörten dem vireszenten Typus an. Vergleicht man die Temperaturverläufe dieser beiden in der Art und Häufigkeit der aufgetretenen Chlorophyllaberranten deutlich verschiedenen Jahre jeweils ab der Aussaat, so zeichnet sich das Jahr 1955 durch tiefere Tagesmittel ab der zweiten vom Aussaatbeginn gerechneten Pentade aus (Abb. 2, Tabelle 6). Nimmt man an, daß die Frequenz der Chlorophyllaberranten durch niedrigere Temperaturen erhöht wurde, so dürften die niedrigen Temperaturen während der ersten Pentade allein die Frequenz der Chlorophyllaberranten nicht wesentlich beeinflusst haben, da in diesem Abschnitt die Temperaturen 1956 mit 3,6° C wesentlich tiefer lagen als 1955 mit 9,2° C. Auch wurden in beiden Jahren in der ersten Pentade Frosttemperaturen verzeichnet, welche allerdings kaum die Samen erreicht haben dürften, da der Boden nur ganz oberflächlich gefroren war. Die um 0° C liegenden Minima während und einige Tage nach der Aussaat dürften daher ebenfalls keinen

Tabelle 6. *Temperatur-Pentaden-Mittel ab Aussaatbeginn (1955—1958) in °C*

Tage ab Aussaat	Pentade	1955	1956	1957	1958
1—5	1	9,2	3,6	9,0	5,0
6—10	2	7,6	11,3	14,5	7,9
11—15	3	4,7	13,3	12,4	10,3
16—20	4	5,6	7,0	7,0	10,5
21—25	5	10,3	11,5	15,0	12,8
26—30	6	17,3	10,6	16,8	16,9
Chlorophyll- Aberranten, gesamt . .		0,2—0,4 %	0,01 %	0,02 %	—
Prozente vireszenter Aberranten.		0 %	82 %	91 %	—

Einfluß auf die Bildung letaler Chlorophyllaberranten gehabt haben. Ein Vergleich der Temperaturen des Jahres 1955 mit denen des Jahres 1958 läßt weiter vermuten, daß auch nicht die Temperatur der zweiten Pentade allein im Jahre 1955 den Ausschlag für die abnorm hohe Frequenz der Chlorophyllaberranten gab (1958 war die nicht durch Auszählung geschätzte Aberrantenfrequenz gering). Die stärkste mittlere Temperaturabweichung des Jahres 1955 findet sich in der dritten und vierten Pentade mit den Mitteln von 4,7 bzw. 5,6° C, so daß vermutlich die niedrigen Temperaturen etwa ab dem 10. Tage nach der Aussaat, also etwa zur Zeit, wenn die Koleoptylen sichtbar wurden, die Frequenz albinotischer Keimpflanzen erhöhte und ein eventuelles Ergrünen albinotischer Pflanzen verhinderte. (Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß die 1955 häufiger als 1956 vorgekommenen, um 0° C liegenden Minima in der 3., 4. und 5. Pentade die Aberrantenfrequenz hinaufsetzte, sowie daß die Unterschiede der Bodenfeuchtigkeit einen Einfluß auf sie ausübten.)

Für das verschieden häufige Vorkommen vireszenter Keimpflanzen in den Jahren 1956 (etwa 0,01 %) und 1957 (etwa 0,02 %) geben die Temperaturverläufe keine deutlichen Anhaltspunkte. Vor allem ist aus ihnen nicht ersichtlich, warum die Nachkommenschaften von vireszenten Pflanzen keine Vireszenz zeigten (1956—1957 und 1957—1958). Für die Manifestierung der Vireszenz dürften demnach feinere Nuancen der Wachstumsbedingungen der Keimpflanzen und eventuell der Ausreifebedingungen des Samens maßgeblich sein.

### E. Diskussion

Bei den näher untersuchten vireszenten Pflanzen, welche 1957 in den Linien 3599, 3572 und 4165 aufgetreten waren, dürfte es sich um erbliche, jedoch nur unter spezifischen Bedingungen sich manifestierende Chlorophylldefekte gehandelt haben. Ob es sich hierbei um eine kerngebundene oder durch die Plastiden abgetragene Vererbung handelt, kann hier nicht entschieden werden.

Die meisten der zahlreichen spontan und in Mutationsexperimenten aufgefundenen erblichen Chlorophylldefekte zeigten einen monofaktoriellen Erbgang und eine nur geringe Abhängigkeit ihrer Manifestation von Umweltbedingungen im homozygot-rezessiven Zustand. Hierzu gehören vor allem die vielfach beschriebenen *albina*- und *xantha*-Mutanten. In einigen Fällen wurde jedoch eine deutliche Abhängigkeit der Manifestation spezifischer Chlorophylldefekte von der Temperatur festgestellt. So fand GASSNER (1915) bei Untersuchungen über Entwicklungsbeschleunigung mittels verschiedenen Keimungstemperaturen, daß unter mehreren untersuchten Sorten nur der „Uruguay“-Hafer bei einer Keimungstemperatur von 1—20° C weiße Keimpflanzen ausbildete. Diese waren entweder letal oder ergrünten allmählich. Bei den Keimungstemperaturen von 5—6, 12 und 24° C zeigte dieselbe Sorte keinerlei Chlorophylldefekte. Nach HALLQUIST (1923) hatte eine zwergartige Mutante der Gerste bei Keimungstemperaturen von 0—10° C letale, gelblich weiße, bei 12—15° C letale, nur zum Teil ergrünte und bei 20° C vitale, grüne Pflanzen. COLLINS (1927) beschreibt eine Gerstenmutante, welche unter 7° C *albina* und ober 18° C normal grüne Pflanzen ausbildete und konnte diese Eigenschaft auf einen rezessiven Faktor zurückführen. Nach NYBOM (1955) wurde der Chlorophyll- und Carottingehalt verschiedener Chlorophyllmutanten bei Gerste durch kühle Anzuchttemperaturen (12° C gegenüber 21° C) je nach Mutante verschieden stark vermindert oder vermehrt. Nach Röntgenbestrahlung von Gerstensamen fand GAUL (1957), daß in gleich behandelten Material nach Freilandaussaat der M<sub>2</sub>-Generation die relative Häufigkeit von *albina*-Mutationen viel größer war als nach Aussaat in warmen Frühbeetanlagen und führte den Unterschied auf die rauen Feldbedingungen und insbesondere die kalten Frühjahrsnächte zurück. Derselbe Autor (persönliche Mitteilung) fand auch bei Anzucht derselben vitalen Mutanten im Freiland, im Gewächshaus und in einer Klimakammer eine starke umweltbedingte Variabilität erblicher Chlorophylldefekte, wobei tiefe Temperaturen die Ausprägung des Defektes im allgemeinen verstärkten. Auch die eigenen und die von COLLINS (1927) und HOLM (1954) gemachten Beobachtungen, daß gewisse homozygot rezessive Chlorophyllmutanten nur im Freiland, jedoch nicht im Gewächshaus erkennbar waren bzw. die Unterschiede der Farbausprägung im Freiland stärker waren, weisen in derselben Richtung.

Die oben beschriebenen eigenen Beobachtungen lassen vermuten, daß während der Samenquellung die niedrigen Temperaturen noch keinen wesentlichen Einfluß auf die Ausbildung albinotischer Pflanzen hatten, sondern eher während des ersten Keimlingswachstums.

Alle diese Ergebnisse zeigen, daß eine Prüfung von Nachkommen vireszenter Pflanzen unter Bedingungen, welche auch nur wenig von den Anzuchtbedingungen der Mutterpflanzen abweichen, unter Umständen keinen Nachweis für den tatsächlich erblich bedingten, einmal beobachteten Chlorophylldefekt erbringen wird.



Die Chlorophyllaberranten traten vereinzelt und bis auf die wenigen Linien, bei denen zum Teil erbliche Ursachen des Chlorophylldefektes nachgewiesen werden konnten, mehr oder weniger gleichmäßig über die zahlreichen Parzellen verstreut auf. Wären vor allem edaphische Faktoren die Ursache der Chlorophylldefekte gewesen, so wäre bei dem engen Standraum der einzelnen Pflanzen ein mehr gruppenweises Auftreten von Chlorophyllaberranten zu erwarten gewesen.

Es fiel auf, daß bei Pflanzen, deren Haupttrieb albinotisch-vireszent war, die erste oder die beiden ersten Nebenachsen (Bestockungstriebe) ebenfalls anfangs albinotisch waren, obwohl sie erst 1—2 Wochen nach dem Haupttrieb sichtbar wurden, und ihr Wachstum daher unter anderen, meistens wärmeren Temperaturen erfolgt war. Zur Zeit ihres Auflaufens war der Haupttrieb schon weitgehend ergrünt. Es handelte sich dabei um vireszente Pflanzen, deren Nachkommen im Freiland normal grün waren, bei denen somit sicherlich spezifische Auslösebedingungen für den anfänglichen Chlorophyllmangel nötig waren. Nun sind die Initialen von 3—4 Nebenachsen im Embryo bereits angelegt, so daß der Albinismus solcher Pflanzen auf einen alle Sproßinitialen des Embryos bzw. die noch sehr jungen Bestockungstriebe der Keimpflanze betreffenden spezifischen Zustand hinweist, welcher die beobachtete Verzögerung der Chlorophyllausbildung zur Folge hat. Die Determinierung zur albinotischen Vireszenz dürfte somit in einem sehr frühen Wachstumsstadium an allen zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Sproßinitialen stattgefunden haben. Dies gilt für beide hier in Betracht zu ziehenden Möglichkeiten, nämlich den Fall einer spezifisch genotypischen Grundlage des nur unter spezifischen Umweltbedingungen sich manifestierenden anfänglichen Chlorophyllmangels, als auch für den Fall einer nicht spezifisch erblich bedingten Auslösung desselben.

Im Hinblick auf die Vireszenz der ersten 3 Sproßachsen ist theoretisch die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß bei vireszenten Pflanzen der Chlorophylldefekt schon während der Ausbildung des Embryos oder während der Reifung des Samens an der Mutterpflanze determiniert wurde. Die Temperaturverläufe während der Samenreife in den Jahren 1954 und 1955 geben jedoch keinen Hinweis auf einen Zusammenhang mit den verschiedenen Frequenzen und Arten von Chlorophyllaberranten in den beiden Folgejahren.

Auch der Nachweis eines nicht spezifisch erblich bedingten Auftretens der beschriebenen Vireszenz ist im Einzelfall nicht leicht zu erbringen. Streng genommen ließe sich ja erst dann von einem nicht durch spezifische Genotypen bedingten, dauernden oder nur anfänglichen Chlorophylldefekt sprechen, wenn unter bestimmten Umweltbedingungen mehr oder weniger alle Genotypen der Spezies diesen Chlorophylldefekt aufweisen, etwa so wie es bei im Dunkeln herausgezogenen Keimpflanzen der Fall ist. Ein ähnlich generell auftretender Chlorophyllmangel, als dessen Ursache sich bestimmte, reproduzierbare (Reife- und) Keimungsbedingungen nachweisen ließen, welche denen im Freiland vorkommenden ähnlich sind, dürfte bisher nicht bekannt sein.

Eine Reihe von Angaben über die Häufigkeit spontaner Chlorophyllmutanten bei Gerste beruhen auf Auszählungen abnorm gefärbter Keimpflanzen im Freiland (DIDUS 1936, PETO 1937 u. a.). Nach den vorliegenden Beobachtungen wird auf diese Art die spontane Mutationsrate kaum richtig erfaßt werden können, auch

nicht die der leichter beurteilbaren *albina*-Mutationen. Eine Überschätzung der Mutantenfrequenz könnte erfolgen, wenn, wie 1955, zahlreiche weiße bis weißgelbliche, letale Keimpflanzen auftreten, welche jedoch entsprechend den *albina*-Frequenzen in den Nachkommenschaften der Mutterlinien sicherlich keine monofaktoriell spaltenden *albina*-Mutanten waren, oder wenn, wie es 1956 und 1957 vorkam, albinotisch vireszente Individuen auftreten, welche bis zum Zwei- oder Drei-Blattstadium von *albina*- oder *xanthalba*-Mutanten nicht zu unterscheiden sind, deren Nachkommen jedoch fast ausschließlich normal grün sind. Eine Unterschätzung von *albina*-Mutanten könnte bei Auszählungen im Freiland andererseits dadurch verursacht werden, daß die Keimpflanzen von *albina*-Mutanten häufig eine schwächere Triebkraft haben oder langsamer als normal grüne Genotypen wachsen.

Ein Vergleich der Häufigkeiten sichtbar gewordener *albina*-Keimpflanzen nach Freiland- und Gewächshaussaat (Pikierkästchen) wurde in 2 Jahren bei der für *albina* spaltenden Röntgenlinie X-52 durchgeführt. In beiden Jahren war der ermittelte Prozentsatz von *albina*-Pflanzen im Freiland etwas geringer als im

Tabelle 7. Unter Freiland- und Warmhausbedingungen gefundener Anteil von *albina*-Keimpflanzen einer nach Röntgenbestrahlung erhaltenen, für *albina* spaltenden Gerstenlinie (X-52) in drei aufeinander folgenden Selbstungsgenerationen (X<sub>6</sub> bis X<sub>8</sub>)

	Freiland				Warmhaus				Erwartete <i>albina</i> <sup>1</sup> %
	grün	<i>albina</i>	vires- zent	<i>albina</i> %	grün	<i>albina</i>	vires- zent	<i>albina</i> %	
1956, X <sub>6</sub>	1186	74	—	5.87	212	18	—	7.83	6.25
1957, X <sub>7</sub>	1578	22	6	1.38	798	16	-	1.97	3.125
1958, X <sub>8</sub>	1628	20	—	1.23	—	—	—	-	1.63

<sup>1</sup> Bei Induktion einer rezessiven Mutation in der X<sub>1</sub>-Generation und unter Ausschaltung jeder Art von Selektion.

Gewächshaus (Tabelle 7). Eine entsprechende Beobachtung wurde auch an für *albina* spaltenden Nachkommen von X<sub>2</sub>-Ähren gemacht, deren eine Hälfte jeweils im Freiland und deren andere Hälfte im Gewächshaus angesät wurde (HÄNSEL, FENZL, CZEIKA 1956).

Verlässliche Angaben über Mutationsraten von Chlorophylldefekten bei Gerste können daher unter Freilandbedingungen nur durch die Bestimmung der Häufigkeit von spaltenden Pflanzen-Nachkommenschaften gewonnen werden. Diese gehen auf durch Mutation meist nur teilweise heterozygot gewordene Pflanzen zurück. Mutationen, von denen nur ein kleiner Teil des generativen Gewebes betroffen wurden, können allerdings auch bei dieser Methode übersehen werden.

In den Jahren 1955—1958 wurden unter 4731 im Freiland angesäten Nachkommen einzelner Pflanzen eine für *albina* (59 grün:16 weiß), eine für *xantha* (128 grün:14 gelb) und eine für *viridis* (110 grün:19 hellgrün) spaltende Nachkommenschaft gefunden. (Diese 3 Linien wurden in den Tabellen nicht berücksichtigt). Die Mutationsrate für Chlorophylldefekte betrug in diesem Falle demnach etwa 0,06% und die für *albina* etwa 0,02%.

### Zusammenfassung

Es wurden in 3 aufeinanderfolgenden Jahren die Häufigkeit von deutlich chlorophylldefekten Keimpflanzen (= Chlorophyllaberranten) bei Sorten, Röntgenlinien ( $X_5$ — $X_7$ ) und Kreuzungslinien ( $F_3$ — $F_5$ ) von (autogamer, diploid) Sommergerste an einzelkornweise im Freiland gesäten Versuchsparzellen bestimmt.

1955 wurden bei kühleren Auflaufbedingungen unter etwa 187 000 Pflanzen ausschließlich letale, weiße bis gelbliche Chlorophyllaberranten mit einer Häufigkeit von 0,2—0,4%, in den Jahren 1956 und 1957 bei wärmeren Auflaufbedingungen unter etwa 952 000 Pflanzen, welche zum überwiegenden Teil Nachkommen der 1955 beobachteten Pflanzen waren, fast ausschließlich vitale, vireszente Chlorophyllaberranten mit den Häufigkeiten von 0,01 bzw. 0,02% gefunden. Die (stärker heterozygoten) Kreuzungslinien zeigten in den 3 Beobachtungsjahren keine einheitliche Tendenz zu höheren oder niedrigeren Häufigkeiten von Chlorophyllaberranten als die (mehr homozygoten) Sorten. Auch die Röntgenlinien, welche in der  $X_2$ -Generation nach anderen Gesichtspunkten ausgeselen worden waren, zeigten keine diesbezügliche Tendenz.

Die Selbstungsnachkommen von 34 Linien, welche 1955 durchschnittlich 0,28% albinotisch letale Chlorophyllaberranten gezeigt hatten, besaßen 1956 unter etwa 60 000 Pflanzen keine einzige Chlorophyllaberrante. Die direkten Nachkommen von 73 in den Jahren 1956 und 1957 im Freiland vireszent-vitalen Pflanzen waren sowohl bei Aussaat im Freiland als auch im Gewächshaus (mit Ausnahme einer vitalen *trigina*-Mutante) normal grün.

In einer weiteren Selbstungsgeneration von vier 1957 albinotisch-vireszenten und 1958 normal grünen Pflanzen zeigten 1959 3 Nachkommenschaften unter kühlen Anzuchtbedingungen im Gewächshaus, 6, 11 und 40% albinotisch letale Pflanzen, so daß die Nachkommen derselben vireszenten Pflanzen je nach den Bedingungen während des Auflaufens (und eventuell bereits während der Samenreifung) in einem Jahr normal grün und im folgenden albinotisch letal waren.

Ein Vergleich der Temperaturverläufe vom 1.—30. Tag nach der Aussaat in den verschiedenen Jahren läßt vermuten, daß nicht die niedrigen Temperaturen während der Samenquellung (1.—10. Tag nach der Aussaat), sondern die während des ersten sichtbaren Keimlingswachstums (10.—20. Tag nach der Aussaat) die abnorm hohe Frequenz letaler Chlorophyllaberranten im Jahre 1955 verursachten.

Aus dem Befund, daß bei den im Freiland genauer beobachteten vireszenten Pflanzen die zu verschiedenen Zeiten sichtbar werdenden ersten 2—3 Sproßachsen anfangs albinotisch waren, wird geschlossen, daß die Determinierung zu verzögerter Chlorophyllausbildung in einem sehr frühen Wachstumsstadium an allen zu dieser Zeit vorhandenen Sproßachsen erfolgte.

Die aus den Beobachtungen resultierenden möglichen Fehlerquellen bei der Bestimmung von Mutantenfrequenzen im Freiland werden besprochen.

### Literatur

- ACKERMANN, A.: Untersuchungen über eine in direktem Sonnenlicht nicht lebensfähige Sippe von *Avena sativa*. Hereditas (Lund) **3**, 147—177 (1922).  
BREWBAKER, H.: Studies of self fertilization in rye. Minn. Agric. exp. St. techn. Bull. **40** (1926). Zit. nach DE HAAN 1933.



- COLLINS, J. L.: A low temperature type of albinism in barley. *J. Hered.* **18**, 331—334 (1937).
- DIDUS, V. J.: Beiträge zum Studium der spontanen Variabilität „reiner“ Linien von *Hordeum*.  
I. Eine neue Varietät zweizeiliger Kulturgerste *Hordeum distichum* var. *triaristatum* mihi. *J. Bot. URSS.* **21**, 189—195 (1936). Zit. nach SMITH 1951.
- DUMON, A. G.: The heredity of chlorophyll deficiencies in *Secale cereale* L. *Caryologia* (Pisa) Suppl. **6**, 1221—1225 (1954).
- Invloed van polygenen en oligogenen op de opbrengst van rogge (*Secale cereale* L.) *Agri-cultura* **7**, 495—518 (1959).
- EMERSON, R. A.: The inheritance of certain formes of chlorophyll reduction in corn leaves. *Nebr. Agric. exp. St. Ann. Rep.* **25**, 89 (1912). Zit. nach DE HAAN 1933.
- FUJI, T.: Virido-albina mutant in diploid wheat induced by X-rays. *Wheat Inform. Serv.* Kyoto, **11**—12, 1956, (nach *Plant Breeding Abstracts* **27** (1) 392, 1957).
- GASSNER, G.: Über einen Fall von Weißblättrigkeit durch Kälteeinwirkung. *Ber. dtsh. bot. Ges.* **33**, 478—486 (1915).
- GAUL, H.: Die Wirkung von Röntgenstrahlen in Verbindung mit CO<sub>2</sub>, Colchizin und Hitze auf Gerste. *Z. Pflanzenzücht.* **38**, 397—429 (1957).
- GUSTAFSSON, A.: The mutation systems of the chlorophyll apparatus. *Lunds. Univ. Årsskr.*, N. F. Avd. **2**, **36**, 1—40 (1940).
- Mutation in agricultural plants. *Hereditas* (Lund) **33**, 1—100 (1947).
- HAAN, H. DE: Inheritance of chlorophylldeficiencies. *Bibliogr. Genet.* **10**, 357—412 (1933).
- HÄNSEL, H., E. FENZL u. G. CZEIKA: Genetische und chromosomale Labilität von Sorten und Linien. *Ber. Arbeitstagg. 1956, Arbeitsgem. der Saatzuchtleiter*, S. 17—48, 1956.
- HALLQUIST, C.: Gametenelimination bei der Spaltung einer zwerghaften und chlorophylldefekten Gerstensippe. *Hereditas* (Lund) **4**, 191—205 (1923).
- Chlorophyllmutanten bei Gerste, ihre Entstehung und primäre Spaltungen. *Hereditas* (Lund) **5**, 49—83 (1924).
- HOLM, G.: Chlorophyllmutations in barley. *Acta agric. scand.* **4** (3), 457—471 (1954).
- IMMER, F. R., and M. T. HENDERSON: Linkage studies in barley. *Genetics* **28**, 419—440 (1943).
- MIYAZAWA, B.: Vererbung der Blattfarbe bei der Gerste. *Jap. Z. Vererb.* **1** (1921). Zit. nach DE HAAN 1933.
- PETO, F. H.: Genetical studies on mutants in the progeny of heat treated barley. *Canad. J. Res. C* **15**, 215—229 (1937). Zit. nach SMITH 1951.
- ROBERTSON, D. W., and D. H. COLEMAN: Location of glossy and yellow seedlings in two linkage groups. *J. Amer. Soc. Agron.* **34**, 1028—1034 (1942).
- SCHWARTZ, D.: The chlorophyllmutants of maize. *Bot. Gaz. (Chicago)* **111**, 123—130 (1949).
- SIRKS, M. J.: Über einen Fall vererbbarer Lichtempfindlichkeit des Chlorophylls beim Roggen. *Genetica* **11**, 375—386 (1929).
- SMITH, L.: Cytology and genetics of barley. II. *Bot. Rev.* **17**, 133—203 (1951).
- ZIMMERMANN: Landwirtsch. Ann. mecklenb. patriot. Vereins **17**, Nr 7ff. (1908). Zit. nach GASSNER 1915.

Hochschuldozent Dipl.-Ing. Dr. H. HÄNSEL,  
Wien VIII, Langegasse 61/7

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie, Laboratorium Kühn, Tübingen, und dem Shanklin Laboratory of Biology, Wesleyan University, Middletown, Conn., USA

## ÜBER DIE WIRKUNGSWEISE UND GENETISCHE KONTROLLE DES TRYPTOPHANOXYDASESYSTEMS BEI *EPHESTIA KÜHNIELLA*\*

Von

ALBRECHT EGELHAAF und ERNST CASPARI\*\*

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 27. Oktober 1960)

Bei der rotäugigen Mutante *a* von *Ephestia kühniella* ist das erste Glied der Reaktionskette, die zur Bildung der Ommochrompigmente im Auge und in anderen Organen führt, unterbrochen (KÜHN 1941, BUTENANDT 1953, KÜHN 1956). Das Enzymsystem, das diesen Schritt (Tryptophan  $\rightarrow$  Kynurenin) vermittelt, ist nur bei der Wildform wirksam und kann dort *in vitro* nachgewiesen werden (EGELHAAF 1958; KÜHN und EGELHAAF 1958).

Die Mutation  $a^+ \rightarrow a$  greift aber auch in den Stoffwechsel anderer Verbindungen (Proteine und Lipide: CASPARI 1946, CASPARI und RICHARDS 1948; Pteridine: HADORN und KÜHN 1953) ein. Aus der Feststellung dieses polyphänen Wirkungsmusters erwuchs die Frage: Ist der Verlust der Tryptophanoxydase als die primäre Mutationsfolge anzusehen, und welche Beziehungen bestehen zwischen ihr und dem übrigen Differenzmuster? Ist das Enzym selbst das erste faßbare Genprodukt, so sollte seine Menge oder Aktivität der Gendosis proportional sein (wenngleich Dosiseffekte dieser Art das Vorliegen von Primärphänen nicht zwingend beweisen). Zur Prüfung dieser Verhältnisse wurden nun homozygote Normaltiere (+/+) mit heterozygoten Individuen (+/*a*) auf ihre Pigmentmenge und Enzymaktivität verglichen.

Quantitative Unterschiede der Enzymaktivität bei verschiedenen Genotypen oder der Wirkungsverlust bei der Mutante lassen aber noch immer die Möglichkeit offen, daß diese Differenzen nicht das Enzym selbst, sondern einen Hemmfaktor betreffen.

Die Prüfung dieser Alternative durch Homogenatmischversuche hatte die Wirksamkeit eines *a*-kontrollierten Inhibitors unwahrscheinlich gemacht (KÜHN und EGELHAAF 1958). Darüber hinaus versprachen diese Versuche weitere Einsicht in den Ablauf der Kynureninbildung; sie wurden daher wiederholt und ergänzt.

### Material und Methodik

Für den Vergleich der Enzymaktivitäten wurden Tiere der Stämme B II ( $a^+/a^+$ ) und aa 0 ( $a/a$ ) aus dem Shanklin Laboratory of Biology, Middletown, verwendet. Sie konnten, da sie durch 40 Generationen rückgekreuzt worden waren, als isogen gelten.

Als Ausgangsmaterial für die Enzymbestimmungen wurden Ovarien freipräpariert und unter Eiskühlung gesammelt. Danach wurden sie in einem Glashomogenisator in folgendem

\* Herrn Prof. Dr. ALFRED KÜHN in dankbarer Verehrung zum 75. Geburtstag gewidmet.

\*\* Die Untersuchungen wurden ermöglicht durch Unterstützung der National Science Foundation (Grant G 9227).

Medium zerkleinert: m/15-Phosphatpuffer  $pH$  7,2 10,0 ml; Methylenblau (5 mg/25 ml) 0,5 ml;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (20 mg/25 ml) 0,5 ml (vgl. EGELHAAF 1958). Die Homogenatkonzentration betrug im allgemeinen 2 Ovarien (= 0,1–0,2 mg N)/0,1 ml Medium. Um die Homogenate von Gewebsresten und unwirksamen Zellpartikeln zu befreien, wurden sie zunächst 15 min unter Eiskühlung mit 3000 U/min zentrifugiert. Den Überstand verwendeten wir als Enzymlösung und verteilten ihn auf die einzelnen Proben. Zu je 0,1 ml wurde als Substrat die halbe Menge L-Tryptophan (Schuchardt, München; 0,1%ige Lösung in m/15-Phosphatpuffer  $pH$  7,2) zugesetzt. Die Kontrollen enthielten anstelle des Substrates bzw. des Enzyms nur Puffer. Die Inkubation erfolgte bei 37° C in kleinen Glasröhrchen im Wasserbad unter ständigem Schütteln; die Dauer betrug 90 min. Danach wurden die Proben mit Aceton enteiweißt und durch Zentrifugieren vom Niederschlag befreit. Zur Isolierung des gebildeten Kynurenins trennten wir die Extrakte durch zweidimensionale Papierchromatographie auf (in 70% Propanol und 4% Na-citrat; EGELHAAF 1958) und bestimmten das Kynurenin fluorometrisch (KÜHN 1955). Die Enzymaktivität wurde auf den Stickstoffgehalt bezogen, den wir mittels einer Mikrokjeldahleinrichtung bestimmten.

## Ergebnisse

### a) Gendosis und Enzymaktivität

In 9 Versuchen wurde die Enzymaktivität der Ovarien von homo- und heterozygoten Weibchen bestimmt. In jedem Versuch verwendeten wir gleichzeitig mehrere Homogenatproben jedes Genotyps, die damit vollständig gleichen

Tabelle 1. Vergleich der Enzymaktivität beider Genotypen. Einzeldaten jedes Versuchs in % auf den Höchstwert bezogen; je 25 Bestimmungen

Mittelwerte $\bar{x} \pm 3s_{\bar{x}}$	
+/+	+/a
95,0 $\pm$ 6,93	55,4 $\pm$ 11,6

Bedingungen ausgesetzt waren. Die Streuung der Einzelwerte innerhalb eines Versuchs war dementsprechend gering, von Versuch zu Versuch jedoch beträchtlich. Diese Unterschiede mögen teils physiologische Verschiedenheiten des Materials (geringe Altersunterschiede, Zuchttemperatur vor Versuchsbeginn u. a.), teils geringfügige Änderungen der Versuchsbedingungen widerspiegeln. Um sie zu elimi-

nieren, wurden die Meßdaten (Kynureninmenge als Maß der Enzymaktivität) innerhalb eines Versuchs auf den höchsten Wert der Reihe (= 100%) bezogen. Auf diese Weise läßt sich zeigen, daß die *Homozygoten eine gesichert höhere Enzymaktivität* entfalten; sie ist nahezu doppelt so hoch als bei +/a-Tieren (Tabelle 1).

### b) Gendosis und Pigmentmenge

In 3 Versuchen prüften wir nun den Pigmentgehalt in den Augen derselben Tiere, deren Ovarien der Tryptophanoxydase-Bestimmung gedient hatten.

Hierfür wurden die Köpfe von je 4 Tieren in 0,3 ml Ameisensäure zerrieben und die Extrakte nach mehrmaligem Umschütteln und längerem Stehenlassen (15 min) mit derselben Menge Methanol verdünnt. Nach Abzentrifugieren des Rückstandes wurde die rotbraune Lösung papierchromatographisch getrennt ( $HCOOH$  [85%]—Methanol—HCl konz. in den Verhältnissen 100:18,5:0,6; abgewandelt nach BUTENANDT, BIEKERT und LINZEN 1958). Auf jedem Bogen wurden Extrakte beider Genotypen nebeneinander aufgetragen. Die Auswertung der eindimensional entwickelten Streifen erfolgte im Extinktionsschreiber (Zeiss).

Die Aufeinanderfolge der Pigmentzonen im Chromatogramm entsprach der früher beschriebenen (KÜHN und EGELHAAF 1959): Am langsamsten wandert das dunkelviolette Ommin, darüber folgt eine rote Zone (Pterorhodin und „Pigment I“) und schließlich nahe der Lösungsfront das Xanthommatin. Ungeachtet



der Frage, ob es sich bei allen Pigmenten um die nativen Produkte handelt, konnte in Lage und Färbung der Zonen kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen gefunden werden; diese stimmen also in qualitativer Hinsicht überein. Aber auch in der Gesamtmenge der Pigmente unterscheiden sie sich nicht signifikant (Tabelle 2). *Es genügt also die reduzierte Enzymaktivität im heterozygoten Zustand, um eine volle Ausfärbung der Augen hervorzurufen.*

c) Prüfung auf Inhibitorwirkung

Wurden gleiche Mengen von  $\alpha^+$ - und  $\alpha$ -Homogenaten mit L-Tryptophan inkubiert, so ergab sich keine Verminderung der Kynureninproduktion; sie war im Gegenteil höher als erwartet und erreichte etwa die Aktivität eines mengengleichen  $\alpha^+$ -Homogenats (Abb. 1). Daß diese Steigerung tatsächlich der Mitwirkung einer vom  $\alpha$ -Homogenat stammenden, hitzelablen Komponente zuzuschreiben ist, beweist folgender Versuch:

Eine Probe von  $\alpha$ -Gewebebrei wurde durch Einstellen in ein kochendes Wasserbad (für 80 sec) denaturiert, nach Abkühlen im Homogenisator resuspendiert

Tabelle 2. Vergleich der Pigmentmengen beider Genotypen. Je 11 Bestimmungen; E = Extinktion in Planimetereinheiten

	Mittelwerte $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$	
	$\alpha / \alpha^+$	$\alpha^+ / \alpha$
E	90,1 $\pm$ 5,47	86,2 $\pm$ 3,26

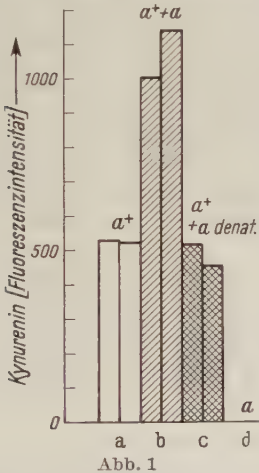


Abb. 1. Tryptophanoxydase-Aktivität (= Kynurenausbeute in Fluoreszenzeinheiten) gleicher Homogenatmengen in je 2 Parallelansätzen. a:  $\alpha^+$  (0,1 ml); b:  $\alpha^+$  (0,1 ml) +  $\alpha$  (0,1 ml); c:  $\alpha^+$  (0,1 ml) +  $\alpha$  (0,1 ml) hitzedenaturiert; d:  $\alpha$  (0,1 ml)

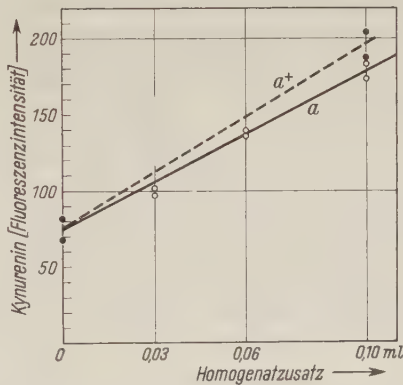


Abb. 2. Tryptophanoxydase-Aktivität eines  $\alpha^+$ -Homogenats (0,1 ml) nach Zusatz verschiedener Mengen von  $\alpha$ -Homogenat (—) und derselben Menge  $\alpha^+$ -Homogenat als Kontrolle (---)

und dem aktiven  $\alpha^+$ -Homogenat beigemischt. Nach Inkubation mit L-Tryptophan erhöhte sich die Kynurenausbeute nicht über das Niveau, das dem  $\alpha^+$ -Anteil entsprach (Abb. 1c).

Wurden  $\alpha^+$ - und  $\alpha$ -Homogenate in verschiedenen Verhältnissen gemischt, so beobachteten wir innerhalb gewisser Grenzen eine Proportionalität zwischen Kynurenausbeute und Gesamt-Homogenatmenge (Abb. 2).

Diese Resultate bestätigen unsere früheren Befunde (KÜHN und EGELHAAF 1958), wonach unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine von dem  $\alpha$ -Partner

ausgehende Hemmwirkung beobachtet werden kann. Sie legen im Gegenteil das Vorhandensein einer Komponente enzymatischer Natur nahe, die an der Umsetzung Tryptophan  $\rightarrow$  Kynurenin beteiligt und auch in der Mutante wirksam ist.

#### d) Formylkynurenin als Intermediärprodukt

Nach Untersuchungen am Tryptophanoxydase- (oder -„Pyrrolase“-) System bei Säugern (KNOX und MEHLER 1950; MEHLER und KNOX 1950; KNOX 1955; HAYAISHI, ROTHBERG, MEHLER und SAITO 1957) und Bakterien (TANAKA und KNOX 1958) sind mindestens 2 Teilreaktionen an der Kynureninbildung beteiligt.

Als Zwischenprodukt konnte nur Formylkynurenin gefaßt werden. Dieses ist als Kynureninvorstufe auch bei *Drosophila* nachgewiesen worden (GREEN 1952; GLASSMAN 1956). Wir legten uns daher die Frage vor, ob die  $a$ -kontrollierte Teilreaktion in der hydrolytischen Spaltung des Formylkynurenins oder aber in einem vorgeordneten Schritt zu suchen sei.

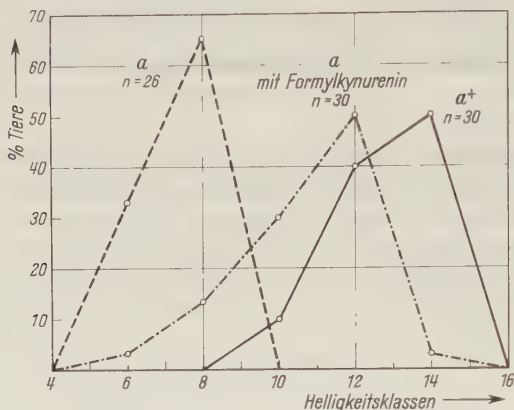


Abb. 3. Variantenverteilung der Augenhelligkeitswerte von  $a/a$ -Tieren mit (— · — · —) und ohne (---) Formylkynurenin sowie von  $+/+$ -Kontrollen (—)

Zu diesem Zweck wurde 30 jungen Puppen (1—2 Tage) je 1—2  $\mu$ l Formylkynureninlösung (5  $\mu$ g/ $\mu$ l)<sup>1</sup> und 26 Puppen derselben Zucht als Kontrollen dieselbe Menge Ringerlösung

injiziert. Nach dem Schlüpfen der Tiere testeten wir die Augen mit den Ostwald-Farbtafeln (zur Technik s. KÜHN und BERG 1955).

Die mit Formylkynurenin gespritzten Tiere bilden Ommochrome, wie die Verdunkelung ihrer Augen (Abb. 3) und die chromatographische Prüfung von Augenextrakten beweist. Die Pigmentierung erreicht nicht ganz den Ausfärbungsgrad von Wildtypaugen, zeigt aber jedenfalls, daß die Mutante Formylkynurenin umsetzen kann.

#### Diskussion

Die Dominanz des  $a^+$ -Allels, die sich hinsichtlich der Augenfarbe in 100%iger Expressivität und Penetranz ausweist (KÜHN und HENKE 1930, 1932), beruht auf dem Verlust der Tryptophanoxydase-Aktivität bei homozygoten Trägern des mutierten Allels. Die Vorstellung, darin die primär faßbare Mutationswirkung zu sehen, wird durch folgende Befunde nahegelegt:  $a$ -Gewebe ist unfähig, in vitro oder in vivo zugesetztes Tryptophan in Kynurenin umzuwandeln (EGELHAAF 1958), außerdem wird proteingebundenes (CASPARI und RICHARDS 1948; BUTENANDT und ALBRECHT 1952) und freies Tryptophan (CASPARI 1946; EGELHAAF 1957) angehäuft. Dazu kommt nun als weiteres Kriterium die „intermediäre“ Enzymaktivität der Heterozygoten. Sie weist dem mutierten Allel gleichfalls Unwirksamkeit bei der Tryptophanoxydation zu, und die einzelnen

<sup>1</sup> Für die Überlassung der Substanz schulden wir Herrn Professor Dr. A. BUTENANDT, München, großen Dank.

Züge des polyphänen Differenzmusters müßten demnach ausschließlich als Folgeerscheinungen des Tryptophanüberschusses oder des Kynureninmangels zu verstehen sein. Für die Konzentrationsunterschiede gewisser Augenpteridine konnte diese Abhängigkeit auch bestätigt werden (KÜHN und EGELHAAF 1955). Ähnliche Dosiseffekte — ermittelt durch Aktivitätsbestimmungen genabhängiger Enzyme — sind auch bei einigen anderen diploiden Organismen beschrieben worden; so für die Tyrosinase (LEWIS und LEWIS 1958) und Xanthindehydrogenase (HUBBY und FORREST 1960) von *Drosophila*, die Amylase von *Bombyx* (MATSUMURA 1948), die Atropinesterase beim Kaninchen (SAWIN und GLICK 1943) und die Galaktose-1-phosphat-uridyl-Transferase (KALCKAR 1957) des Menschen. In diesem letzteren Fall ist allerdings das genetische System noch nicht völlig geklärt. Bei Phenylketonurie-Heterozygoten scheint die Aktivität der Phenylalanin-Oxydase gleichfalls herabgesetzt zu sein (HSIA, DRISCOLL, TROLL und KNOX 1954).

Im Gegensatz zu diesen Fällen intermediärer Enzymaktivität bei Heterozygoten verhält sich die partikelgebundene  $\beta$ -Glucuronidase der Mäuseleber dominant gegenüber dem Allel für erniedrigte Aktivität (LAW, MORROW und GREENSPAN 1952). Das Gen beeinflußt nicht nur die Verteilung auf zweierlei Trägerpartikel, sondern auch das Enzym selbst (PAIGEN 1959). Orientierende Versuche in dieser Richtung hatten bei *Ephestia* ergeben, daß nach Zentrifugierung von Ovarialhomogenaten bis 20000 g sich die Tryptophanoxydaseaktivität im Überstand befindet, also sicher nicht an Kerne und Mitochondrien gebunden ist (CASPARI und EGELHAAF, unveröffentlicht). KNOX und MEHLER (1950) kamen bei dem entsprechenden Enzym der Säugerleber zu demselben Resultat.

Für den normalen Ablauf der Ommochrombildung kommt der Tryptophanoxydase offenbar keine begrenzende Rolle zu; genügt doch schon die halbe Aktivität im heterozygoten Tier, um volle Ausfärbung zu gewährleisten.

Daß die Mutation  $a^+ \rightarrow a$  nicht die Bildung oder Wirkungssteigerung eines Hemmfaktors verursacht, geht aus den Homogenatmischversuchen hervor. Diese zeigen überdies, daß eine Komponente, welche die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion begrenzt, auch bei der Mutante wirksam sein muß. Es liegt nahe, hierbei an die Kynureninformylase zu denken; die Verwertbarkeit von Formylkynurenin als Ommochromvorstufe beweist ihre Anwesenheit auch im  $a/a$ -Gewebe. Die homologe Mutante  $v$  von *Drosophila* kann in gleicher Weise Formylkynurenin in Pigment umwandeln (GREEN 1952; GLASSMAN 1956). Es ist aber auch nicht auszuschließen, daß die wirksame  $a$ -Komponente an der Oxydation des Tryptophans selbst beteiligt ist; ihr Beitrag könnte z. B. in der Aktivierung des Enzyms (Lieferung organischen Peroxyds oder Reduktion des Enzym- $\text{Fe}^{+++}$  zur aktiven Form; TANAKA und KNOX 1958) bestehen. Solange wir aber noch nicht wissen, ob das Enzym aus *Ephestia* in seiner Struktur und Wirkungsweise mit dem aus Bakterien und Säugern isolierten übereinstimmt, und solange noch keine gereinigten Präparate vorliegen, ist diese Frage nicht schlüssig zu entscheiden.

### Summary

1. Mixtures of homogenates of  $a^+/a^+$  (wild type) and  $a/a$  (red eyed mutant) *Ephestia* ovaries, incubated with tryptophan, are able to form kynurenin. The



amount of kynurenin formed is not reduced, compared to  $a^+/a^+$  homogenates, but is on the contrary increased, within limits, proportional to the amount of  $a/a$  homogenate added. If  $a/a$  homogenates are denatured by heat, they lose the ability to increase kynurenin production by  $a^+/a^+$  homogenates. It is concluded that the inability of  $a/a$  homogenates to oxidize tryptophan to kynurenin is not due to the presence of an inhibitor, but to loss of activity of the enzyme catalyzing the reaction.

2. The experiment leads to the further suggestion, that  $a/a$  homogenates contain a component, probably protein, which enhances the production of kynurenin from tryptophan by  $a^+/a^+$  homogenates. This could be the enzyme catalyzing the formation of kynurenin from formylkynurenin, since injection of formylkynurenin into  $a/a$  pupae results in the formation of ommochromes; formylkynurenin acts, then, as a precursor of these pigments in  $a/a$  animals.

3. Homogenates from  $a^+/a$  heterozygotes show a lower tryptophan oxidase activity than  $a^+/a^+$ . Heterozygous animals are, however, able to form the full amount of ommochromes characteristic for  $a^+/a^+$  eyes.

### Literatur

- BUTENANDT, A.: Biochemie der Gene und Genwirkungen. *Naturwissenschaften* **40**, 91 (1953).  
 —, u. W. ALBRECHT: Bestimmungen des Tryptophangehaltes verschiedener Rassen der Mehlmotte *Ephestia kühniella* als Beitrag zur Analyse der Genwirkungen. *Z. Naturforsch.* **7b**, 287 (1952).  
 —, E. BIEKERT u. B. LINZEN: Über Ommochrome. XIII. Isolierung und Charakterisierung von Omminen. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **312**, 227 (1958).  
 CASPARI, E.: On the effect of the gene  $a$  on the chemical composition of *Ephestia kühniella* Zeller. *Genetics* **31**, 454 (1946).  
 —, and J. RICHARDS: On the proteins of  $a^+a^+$  and  $aa$  *Ephestia*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **34**, 587 (1948).  
 EGELHAAF, A.: Der Gehalt an freiem Tryptophan und Kynurenin bei den Genotypen  $a^+$  und  $a$  von *Ephestia kühniella* während der Entwicklung. *Z. Naturforsch.* **12b**, 465 (1957).  
 — Nachweis eines unabhängigen L-Tryptophanoxydase-Systems bei *Ephestia kühniella*. *Z. Naturforsch.* **13b**, 276 (1958).  
 GLASSMAN, E.: Kynurenine formamidase in mutants of *Drosophila*. *Genetics* **41**, 561 (1956).  
 GREEN, M. M.: Mutant isoalleles at the *vermilion* locus in *Drosophila melanogaster*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **38**, 300 (1952).  
 HADORN, E., u. A. KÜHN: Chromatographische und fluorometrische Untersuchungen zur biochemischen Polyphänie von Augenfarbgenen bei *Ephestia kühniella*. *Z. Naturforsch.* **8b**, 582 (1953).  
 HAYAISHI, O., S. ROTHBERG, A. H. MEHLER and Y. SAITO: Studies on oxygenases. Enzymatic formation of kynurenine from tryptophan. *J. biol. Chem.* **229**, 889 (1957).  
 HSIA, D. Y. Y., K. W. DRISCOLL, W. TROLL and W. E. KNOX: Detection by phenylalanin tolerance tests of heterozygous carriers of phenylketonuria. *Nature (Lond.)* **178**, 1239 (1956).  
 HUBBY, J. L., and H. S. FORREST: Studies on the mutation *maroon-like* in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **45**, 211 (1960).  
 KALCKAR, H.: Biochemical mutations in man and microorganisms. *Science* **125**, 105 (1957).  
 KNOX, W. E.: Tryptophan oxidation. In S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN, *Methods in enzymology*, vol. II, p. 242. New York: Academic Press 1955.  
 —, and A. H. MEHLER: The conversion of tryptophan to kynurenine in liver. I. The coupled tryptophan peroxidase-oxidase system forming formylkynurenine. *J. biol. Chem.* **187**, 419 (1950).

- KÜHN, A.: Über eine Gen-Wirkkette der Pigmentbildung bei Insekten. Nachr. Akad. Wiss. Göttingen, math.-phys. Kl. **6**, 232 (1941).
- Ein Fluorometer für Papierchromatogramme. Naturwissenschaften **42**, 529 (1955).
- Versuche zur Entwicklung eines Modells der Genwirkungen. Naturwissenschaften **43**, 25 (1956).
- u. B. BERG: Zur genetischen Analyse der Mutation *biochemica* von *Ephestia kühniella*. Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre **87**, 335 (1956).
- u. A. EGELHAAF: Zur biochemischen Polyphänie bei *Ephestia kühniella*. Naturwissenschaften **42**, 634 (1955).
- The action of the mutation *a* in *Ephestia kühniella* on the formation of kynurenin from tryptophan. Proc. X. Intern. Congr. Genetics II, p. 152, 1958.
- Über die Mutation *br* (*braunäugig*) bei *Ephestia kühniella*. Z. Vererb.-Lehre **90**, 244 (1959).
- LAW, L. W., A. G. MORROW and E. M. GREENSPAN: Inheritance of low liver glucuronidase activity in the mouse. J. nat. Cancer Inst. **12**, 909 (1952).
- LEWIS, H. W., and H. S. LEWIS: Genetic control of tyrosinase systems in *Drosophila melanogaster*. Proc. X. Intern. Congr. Genetics II, p. 167, 1958.
- MATSUMURA, S.: On digestive amylase factors from different strains of silkworms. Jap. J. Genetics **23**, 28 (1948).
- MEHLER, A. H., and W. E. KNOX: The conversion of tryptophan to kynurenine in liver. II. The enzymatic hydrolysis of formylkynurenine. J. biol. Chem. **187**, 431 (1950).
- PAIGEN, K.: Genetic influences on enzyme localisation. J. Histochem. Cytochem. **7**, 248 (1959).
- SAWIN, P. B., and D. GLICK: Atropinesterase, a genetically determined enzyme in the rabbit. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **29**, 55 (1943).
- TANAKA, T., and W. E. KNOX: The nature and mechanism of the tryptophan pyrrolase (peroxidase-oxidase) reaction of *Pseudomonas* and of rat liver. J. biol. Chem. **234**, 1162 (1958).

Dr. ALBRECHT EGELHAAF,

Zoologisches Institut der Universität Tübingen, Hölderlinstraße 12

Prof. Dr. ERNST W. CASPARI,

Department of Biology, University of Rochester, Rochester 20, N. Y., USA

Botany School, University of Melbourne, Parkville N. 2, Australia

## NUCLEAR AND CYTOPLASMIC EFFECTS OF ULTRAVIOLET IRRADIATION IN *NEUROSPORA CRASSA*

By

J. A. PATEMAN\*

(Received July 31, 1960)

A long term study of polygenic inheritance in *Neurospora crassa* is in progress. This required the production of strains with increased genetic variation. Consequently, a number of strains were subjected to repeated doses of ultraviolet irradiation. This paper is concerned with three effects of this irradiation: the viability of the macroconidia produced by the irradiated strains; the sensitivity to ultraviolet of macroconidia produced by the irradiated strains; the germination of ascospores from crosses involving irradiated strains.

### Materials and Methods

The strains of *Neurospora crassa* used had complicated pedigrees. They were derived to a large extent from the Abbot and Lindegren wildtypes.

The usual medium was Fries No. 3 (BEADLE and TATUM 1945). When a compact colonial type growth was required, the usual 1.5% sucrose was replaced by 1.5% sorbose and 0.75% sucrose. All crosses between strains were made on a medium which favoured sexual reproduction (WESTERGAARD and MITCHELL 1947).

The source of ultraviolet radiation was a General Electric Co. Ltd. (G-15 T-8), low pressure, mercury vapour, germicidal lamp. During irradiation, the macroconidia were suspended in 10 ml of water contained in an open Petri dish, which was agitated. The lamp was placed 8.0 cm from the surface of the suspension.

The essential procedure in a typical irradiation experiment was as follows. Macroconidia were harvested from a 14 day old culture, grown at 25°. The spore suspension was filtered to remove mycelial fragments. The spores were washed in sterile distilled water and resuspended in 10 ml of water. A sample aliquot was counted on a haemocytometer. After appropriate dilution, 0.1 ml aliquots each containing 100—200 macroconidia were spread on each of five Petri plates. The Petri plates contained 15 ml of Fries No. 3 plus sorbose medium. These plates were incubated at 25° and provided an estimate of conidial viability. The original spore suspension was irradiated for the desired time interval. After appropriate dilution, 0.1 ml aliquots were spread on each of five Petri plates. The plates were incubated at 25° and provided an estimate of the survival rate after irradiation. The 10 ml of irradiated spore suspension was centrifuged and resuspended in 1.0 ml of sterile distilled water. All of this final suspension was transferred to a Fries No. 3 agar slope. After incubation at 25° for 14 days the resultant culture was used for the next treatment.

### Results

#### *Viability and survival rate of macroconidia after ultraviolet irradiation*

The experiments were started with two strains of opposite mating type. These are referred to by the numerals 1 and 2. Both of these strains were single ascospore isolates from the same wildtype cross. Three irradiation lines were

\* This work was supported in part by a grant from the Anti-Cancer Council of Victoria, Australia.



established from each strain, a 10 second line, a 50 second line and a 90 second line. The general experimental procedure was as follows. The establishment of a 10 second line is given as an example. Macroconidia from strain 1 were exposed to ultraviolet light for 10 seconds under conditions described in the previous section. The irradiated conidia were used to start a vegetative culture which was designated 1.10.1. Macroconidia from 1.10.1 were exposed to ultraviolet for 10 seconds under the same conditions. The irradiated conidia were used to start another culture, which was designated 1.10.2. The procedure was repeated again to give the culture designated 1.10.3 and so on. Three numbers were used to designate a strain. The first indicated the original strain. The second, the period of exposure to ultraviolet light. The third, the number of ultraviolet treatments.

Table 1. *Viability and survival of macroconidia after ultraviolet irradiation*

Number of treatments	Strains											
	1.10		2.10		1.50		2.50		1.90		2.90	
	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S
1	70	70	83	95	73	12	40	8	57	1.00	55	0.30
2	96	97	54	70	70	4	25	0.5	50	< 0.20	48	0.025
3	50	22	100	18	27	1.3	33	9	16	0.04	28	0.20
4	50	100	96	10	26	1.5	15	11	25	0.25	16	0.15
5	40	85	100	28	20	8	48	2	25	0.20	12	0.09
6	100	95	45	87	25	2	12	10	2	< 0.10	20	< 0.10
7	84	72	65	100	65	3	27	0.3	3	< 0.03	1	< 0.001
8	—	—	—	—	44	4	24	10	1	< 0.001	—	—
9	—	—	—	—	—	—	50	1.5	—	—	—	—

V = Viability %; S = Survival %.

In Table 1 the percentage of viable macroconidia and the percentage survival rate after each exposure to ultraviolet are given. The viability and survival rate both fluctuated in successive treatments in the 10 second and 50 second lines. There was no consistent tendency to increase or decrease in either the viability or the survival rate. Consequently, the mean values are used as a measure of the overall effect of the irradiation treatments. In Table 2, the means and variances of the 10 second and 50 second lines are given.

A statistical analysis of the data on viability and survival rate from the 10 second and 50 second irradiation lines is given in Table 3. The t test was used to assess the level of significance of the differences between means. In every case an F test established that the variances were not significantly different, before the t test was used.

Since there was no significant difference in viability between strains 1 and 2 the combined mean was used for the comparisons with the irradiated lines. It can be seen from Table 3 that there was no significant change in conidial viability in either of the two lines which were subjected to successive treatments of 10 seconds irradiation.

Table 2. *The means and variances of the viabilities and survival rates of strains 1 and 2 and irradiated strains derived from them*

Strains	1	2	1 plus 2	1.10.1 to 1.10.6	2.10.1 to 2.10.6	1.50.1 to 1.50.7	2.50.1 to 2.50.8	1.50.1 to 1.50.7 plus 2.50.1 to 2.50.8
Viability								
Mean	66.7	59.3	63.0	70.0	76.7	39.6	29.3	34.1
Variance	72.5	476.5	235.6	761.0	623.0	421.7	249.7	305.3

Strains	1.10.1 plus 2.10.1	1.10.2 plus 1.10.7	2.10.2 to 2.10.7	1.50.1 plus 2.50.1	1.50.2 to 1.50.8	2.50.2 to 2.50.9	1.50.2 to 1.50.8 plus 2.50.2 to 2.50.9
Survival rate							
Mean	82.5	78.5	52.2	10.0	3.4	5.54	3.94
Variance	313	870.7	1469	8.0	5.34	23.33	13.55

Table 3. *Statistical analysis of the viability and survival rates of the 10 second and 50 second irradiation lines*

Comparisons between mean viabilities	t	n	P	Comparisons between mean survival rates	t	n	P
1 v. 2	0.5470	4	> 0.5	(1.10.1 plus 2.10.1) v. (1.10.2 to 1.10.7)	0.1757	6	> 0.8
(1 plus 2) v. (1.10.1 to 1.10.6)	0.5623	10	> 0.5	(1.10.1 plus 2.10.1) v. (2.10.2 to 2.10.7)	1.039	6	> 0.3
1 plus 2 v. 2.10.1 to 2.10.6	1.145	10	> 0.2	(1.50.1 plus 2.50.1) v. (1.50.2 to 1.50.8)	3.443	7	< 0.02
1 plus 2 v. 1.50.1 to 1.50.7	2.291	11	< 0.05	(1.50.1 plus 2.50.1) v. (2.50.2 to 2.50.9)	1.219	8	> 0.2
1 plus 2 v. 2.50.1 to 2.50.8	4.307	12	< 0.01	(1.50.2 to 1.50.8) v. (2.50.2 to 2.50.9)	1.067	13	> 0.3
(1.50.1 to 1.50.7) v. (2.50.1 to 2.50.8)	1.158	13	> 0.2	(1.50.1 plus 2.50.1) v. (1.50.2 to 1.50.8 plus 2.50.2 to 2.50.9)	1.892	15	> 0.05
(1 plus 2) v. (1.50.1 to 1.50.7 plus 2.50.1 to 2.50.8)	3.536	19	< 0.01				

There was a significant decrease in viability in both of the 50 second irradiation lines. Since there was no significant difference between the two 50 second lines, they were combined and compared with the mean of strains 1 and 2. The decrease in viability for the two 50 second lines combined was significant at the 1% level.

The conidial survival rates of 1 and 2, after their first exposure to 10 seconds ultraviolet, were combined to provide an estimate of the initial survival rate. Similarly the survival rates of 1 and 2, after the first 50 seconds exposure, were combined and the mean used as the initial survival rate. In Table 3, the mean survival rates over the successive treatments of the 10 second and 50 second lines are compared with the initial survival rates. There were no significant changes in three of the four lines. But the decrease in the survival rate of strain 1 after successive exposures to 50 seconds ultraviolet was significant at the 2% level. The decrease in survival rate of the two 50 second lines combined was not significant.

The viabilities of both strains which received treatments of 90 seconds decreased to about 1% after 7 to 8 treatments. This decrease in viability was significant at the 0.1% level. The survival rates of both strains decreased from about 1% to less than 0.001%. It was not possible to continue 1.90 and 2.90 after the eighth and seventh treatments respectively, because the irradiated conidia did not produce a viable culture. In fact, both strains showed poor vegetative growth and comparatively sparse conidiation after the fifth and subsequent irradiation treatments.

To obtain a better estimate of their sensitivity to ultraviolet the following experiment was carried out with 1.90.7 and 2.90.6. Macroconidia were harvested, filtered, washed and counted. After exposure of the conidia to ultraviolet for 10 seconds, aliquots of a suitable dilution were spread on each of ten Petri plates. The conidia were irradiated for a further 40 seconds and aliquots of a suitable dilution were spread on ten plates. Finally, the conidia were irradiated for a

Table 4. *Viability and survival rates of macroconidia from 1.90.7 and 2.90.6 after further ultraviolet irradiation*

Strain	Viability (%)		Survival after irradiation (%)					
			10 secs. UV.		50 secs UV		90 secs UV	
	Germlings	Colonies	Germlings	Colonies	Germlings	Colonies	Germlings	Colonies
1.90.7	23	1.0	7.0	0.20	0.40	0.002	0.02	< 0.001
2.90.6	20	1.1	17	1.0	1.0	0.025	0.03	< 0.001

further 40 seconds and aliquots of an appropriate dilution spread on ten plates. Thus additional estimates of the viability of 1.90.7 and 2.90.6 and their survival rates after exposure to 10 seconds, 50 seconds and 90 seconds ultraviolet were obtained. In previous experiments viability and survival rate were estimated from the number of visible colonies. That is, colonies which were about 2 mm diameter or larger after 3—4 days at 25°. In the present experiments an estimate was also made of the number of macroconidia which had germinated. For this purpose germination was defined as the production of a hypha which had branched at least once after 4 days at 25°. On each plate the number of germinated conidia (germlings) in twenty fields of view of a dissecting microscope were counted. The twenty fields covered about  $\frac{1}{16}$  of the total area of the plate. The results are given in Table 4.



It is clear from Tables 1 and 4 that the irradiation treatment of 1.90.7 and 2.90.6 had the following effects. The viability of the macroconidia decreased from about 63% to about 1%. The survival rate, measured by the number of visible colonies, decreased very markedly at all three exposure levels. After 10 seconds exposure it was about 1% compared with an initial value of about 82%. After 50 seconds it was about 0.02%, initial value about 10%. After 90 seconds it was less than 0.001%, initial value about 1%. The number of germinated conidia on the viability plates and on all three series of irradiation plates was about twenty times greater than the number of visible colonies. Few or none of these germings develop into colonies on further incubation. It is apparent that there was a considerable amount of irradiation damage which had the potentially lethal effect of preventing vegetative growth.

#### *Ascospore lethality in irradiated lines*

Mature ascospores are produced by crosses between wildtype strains of *N. crassa* in 14—18 days at 25°. After a heat shock of 45 mins at 60° and incubation at 25°, about 90—100% of mature wildtype ascospores germinate within 15 hrs. The percentage germination of ascospores from appropriate crosses provided a measure of the nuclear and cytoplasmic effects of the ultraviolet irradiation. Two methods were used in setting up the crosses.

The first method was that most commonly used for *Neurospora* crosses. The mating tube was inoculated simultaneously with two strains of opposite mating type. Under these conditions it was assumed that both parents contributed equally to the resultant ascospore progeny. In the second method the mating tube was first inoculated with a single parent strain. After 6 days at 25° the surface of the medium was covered with mycelium and numerous protoperithecia were formed. The protoperithecia were fertilised by the addition of a suspension of conidia of the opposite mating type. The conidia of the second inoculum functioned only as male gametes. They were unable to initiate mycelia and protoperithecia since the medium was completely overgrown by the other mating type. Each ascospore received about half of its nuclear material from each parent, but all of its cytoplasm from the protoperithecial parent. Any one strain could function as the protoperithecial (female) or as the conidial (male) parent. Thus reciprocal crosses were set up which differed only with respect to which parent contributed the cytoplasm to the ascospores. The protoperithecial parent is given first in the cross formula and its strain number is preceded by the female symbol ♀. In crosses where both parents participated equally no symbol precedes the formula.

The percentage germination of the ascospores was estimated as follows. Mature, discharged ascospores were spread on Fries No. 3 minimal medium plus 1.5% agar contained in Petri plates. There were five replicate mating tubes for each kind of cross. At least 600 ascospores from a mating tube were spread on a plate. The plates were kept at 60° for 45 mins., then at 25° for 15 hrs. Then a dissecting microscope was used to count the number of germinated and ungerminated ascospores per plate. The production of a germ tube, however small, was taken to indicate germination. The total of ungerminated ascospores included only those which were black and thus probably mature. The results are given in

Table 5. No figures are given in rows 7 and 9. The appropriate crosses were set up twice, but were all infertile.

A small percentage of *Neurospora* ascospores which do not germinate after a single heat treatment may do so after a second treatment. To check if delayed germination were a source of error, some plates were given two heat treatments. After the first count these plates were given a second heat treatment and further incubation. A second count of the ascospores was then made. The second count of germinated ascospores included all those which had germinated after both the first and second

heat treatments. A comparison between the first and second counts should show if an appreciable number of ascospores only germinated after the second heat treatment. In Table 5, the figures for both the first and second counts are given. There were no significant differences between any of the successive counts.

Comparison of appropriate pairs of crosses provided estimates of both the nuclear and cytoplasmic contributions to ascospore lethality. The comparison between the crosses

Table 5. Germination of ascospores from reciprocal crosses between strains 1 and 2 and irradiated strains derived from them

Cross		Ascospore germination (%)					
		Replicates					Mean
1	1 × 2	97.8	96.8	95.2	97.2	96.0	96.6
2	1 × 2	98.5	98.0	97.7	99.0	96.5	97.9
3	2 × 1	95.2	89.9	92.9	94.2	91.2	92.7
4	1.10.5 × 2.10.5	76.9	84.0	87.0	85.4	79.8	82.6
5	1.10.5 × 2	94.3	95.0	93.9	95.5	93.3	94.4
6	2 × 1.10.5	97.4	89.9	95.3	95.8	92.6	94.2
7	1.50.5 × 2.50.5	—	—	—	—	—	—
8	2.50.5 × 1.50.5	59.2	61.0	68.1	65.8	59.8	62.8
9	1.50.5 × 2	—	—	—	—	—	—
10	2 × 1.50.5	65.1	66.8	79.9	66.1	75.1	70.6
10a	2 × 1.50.5	62.5	70.0	77.7	67.3	76.4	70.8
11	1 × 2.50.5	76.8	79.8	76.6	78.7	76.7	77.7
11a	1 × 2.50.5	76.2	81.0	—	—	—	78.6
12	2.50.5 × 1	73.1	66.0	74.4	73.7	68.7	71.2
13	1.90.5 × 2.90.5	17.7	26.8	23.8	25.7	19.7	22.7
14	1.90.5 × 2.90.5	15.6	31.1	25.6	10.4	26.3	21.8
14a	1.90.5 × 2.90.5	15.0	29.2	26.1	12.0	27.0	21.9
15	2.90.5 × 1.90.5	21.6	43.3	10.8	36.4	31.8	28.8
15a	2.90.5 × 1.90.5	22.3	40.2	12.1	34.0	30.1	27.7
16	1.90.5 × 2	50.0	54.0	47.6	52.2	48.2	50.4
17	2 × 1.90.5	65.4	72.0	77.9	75.3	69.3	72.0
18	1 × 2.90.5	64.2	70.1	64.2	67.4	65.0	66.2
19	2.90.5 × 1	64.1	46.0	58.4	61.2	51.2	56.2

♀ 1 × 2 (row 2, Table 5) and ♀ 1.90.5 × 2.90.5 (row 14, Table 5) is an example. This comparison provided an estimate of the total effect on ascospore germination of nuclei from 1.90.5 and 2.90.5 and of cytoplasm from 1.90.5. These three components may be conveniently designated N. 1.90, N. 2.90 and C. 1.90 respectively. The combined effect of the three components was a reduction of 76.3% in ascospore germination, i.e. N. 1.90 + N. 2.90 + C. 1.90 = 98.1—21.8 = 76.3%. Similarly for the comparison of crosses ♀ 2 × 1 (row 3, Table 5) and ♀ 2 × 1.90.5 (row 17, Table 5). This provided an estimate, N. 1.90 = 20.9%, of the effect of the nuclei from 1.90.5 on ascospore germination. It should be clear from the method of calculation that the estimated components represent the differences, before and after irradiation, of the nuclei and cytoplasms of 1 and 2. That is, the components are estimates of the changes with respect to ascospore germination induced in the nuclei and cytoplasm by the irradiation. A number of such comparisons are given in Table 6. The crosses used in each comparison in Table 6 are referred to by their row numbers taken from Table 5.

Table 6. *Analysis of the data in Table 5 (see text)*

	Comparison	Components	Mean effect	95 % confidence limits
I	2—3	C.1—C.2	5.3	2.6—8.7
	1—4	N.1.10 + N.2.10 + (C.1.10 + C.2.10)/2	13.6	9.0—18.7
	2—5	N.1.10 + C.1.10	3.6	1.9—5.5
	3—6	N.1.10	—1.7	—4.9—2.8
II	3—8	N.1.50 + N.2.50 + C.2.50	29.9	23.8—36.2
	3—12	N.2.50 + C.2.50	21.5	15.9—27.4
	3—10	N.1.50	22.0	14.2—30.3
	2—11	N.2.50	20.2	17.1—23.5
	(3—12)—(2—11)	C.2.50	1.3	—7.6—10.3
III	1—13	N.1.90 + N.2.90 + (C.1.90 + C.2.90)/2	73.9	69.1—78.4
	2—14	N.1.90 + N.2.90 + C.1.90	76.6	64.9—86.3
	(2—16) + (2—18)	N.1.90 + N.2.90 + C.1.90	79.4	70.9—88.0
	(18—14) + (16—14)	N.1.90 + N.2.90 + C.1.90	73.8	48.8—94.4
	3—15	N.1.90 + N.2.90 + C.2.90	64.8	47.4—79.3
	(3—19) + (3—17)	N.1.90 + N.2.90 + C.2.90	57.1	41.7—73.1
	(17—15) + (19—15)	N.1.90 + N.2.90 + C.2.90	72.5	40.0—99.8
	2—16	N.1.90 + C.1.90	47.6	43.2—52.0
	18—14	N.1.90 + C.1.90	44.8	32.3—55.1
	3—19	N.2.90 + C.2.90	36.5	27.5—45.6
	17—15	N.2.90 + C.2.90	44.2	28.4—57.6
	3—17	N.1.90	20.6	14.2—27.5
	19—15	N.1.90	28.3	11.6—42.2
	2—18	N.2.90	31.8	27.7—36.0
	16—14	N.2.90	29.0	16.5—39.3
	(2—26)—(3—17)	C.1.90	27.0	15.7—37.8
	(18—14)—(19—15)	C.1.90	16.5	—9.9—43.0
	(3—19)—(2—18)	C.2.90	4.7	—8.5—17.9
	(17—15)—(16—14)	C.2.90	15.2	—10.9—41.1

In order to provide some measure of the precision of the estimates of the mean effects, the 95% confidence limits were obtained. An angular transformation of the data was made before the confidence limits were calculated. Table 6 includes the mean effect for each comparison, which was based on the transformed data, and the 95% confidence limits of each mean effect. In addition to the single comparisons between two types of cross, a number of multiple comparisons are given in Table 6. The estimates of the cytoplasmic components were necessarily based on such multiple comparisons. Limits (with a degree of confidence greater than 95%) for the mean effects of multiple comparisons were derived from the 95% confidence limits of the single comparisons. The minimum mean effect was taken as the difference between the lower 95% limit of the larger single comparison and the upper 95% limit of the smaller single comparison. The maximum mean effect was taken as the difference between the upper 95% limit of the larger comparison and the lower 95% limit of the smaller single comparison. In some cases the confidence limits included zero, suggesting that the mean effect was not significantly different from zero.

I. The irradiation of 1.10.5 and 2.10.5 resulted in about 14% ascospore lethality in crosses between the two strains. It is probable that about 10% of this lethality was the result of irradiation damage to 2.10.5 and about 4% to 1.10.5. Further partitioning of the components was not reliable because of the small number of comparisons available.



II. Only a limited number of comparisons could be made with 1.50.5 and 2.50.5 since two of the types of cross involving 1.50.5 were sterile. For this reason no estimate could be made of the component C. 1.50. However, the fact that 1.50.5 would not function as the maternal parent in crosses suggests that the irradiation may have caused serious cytoplasmic damage. The value obtained by adding the separate estimates of N. 1.50 and N. 2.50 is 42.5%. This is larger than the 29.9% obtained for N. 1.50 + N. 2.50 + C. 2.50 from the comparison (3—8). The other possible estimate of C. 2.50 was about 1.1%. It is clear that the irradiation produced no detectable effects on the cytoplasm of line 2.50.

III. It was possible to make at least two estimates of each of the nuclear components of 1.90.5 and 2.90.5. The mean estimate for each component was: N. 1.90 = 24.4%, N. 2.90 = 30.4%. The nuclear components indicated that approximately 48% of the nuclei in 1.90.5 and 61% in 2.90.5 carried ascospore lethals. Any such nuclear damage, which could pass through the sexual cycle, would segregate during meiosis and be transmitted to only half the ascospore progeny. Consequently, the percentage of nuclei which carried ascospore lethals would be twice the ascospore lethality attributed to the nuclear component. The two estimates of a nuclear component are not exactly equivalent. For example, the comparison (3—17) provides an estimate of N. 1.90 against a normal genotypic background. But (15—19) gives an estimate of N. 1.90 against a background of irradiated nuclei and cytoplasm. Thus if there were any interaction between the irradiation damage in the nuclei and cytoplasm this might affect the estimate of the nuclear components. Since the two estimates of each nuclear component were similar, there was probably no significant interaction. Consequently, the mean of the two estimates of each nuclear component has been taken as the best estimate.

It was possible to make two independent estimates of both C. 1.90 and C. 2.90 using the difference between two pairs of crosses. One estimate of C. 1.90 was based on the difference between (2—16) and (3—17) which was significantly different from zero at the 1% level. This established that a significant reduction in ascospore germination could be attributed to ultraviolet induced cytoplasmic damage in strain 1.90.5. The other estimate of C. 1.90 was based on the difference between (18—14) and (19—15) which was not significantly different from zero. It was considered that the best available estimate of C. 1.90 was the mean of the two independent estimates namely 21.7%. Neither of the two estimates of C. 2.90 were based on differences which were significantly different from zero at the 1% level. Thus although there was a suggestion of ultraviolet induced cytoplasmic damage in strain 2.90.5 it was not definitely established.

### Discussion

The irradiated strains showed decreased conidial viability and increased sensitivity to ultraviolet. The implications of these results will be discussed separately. The viability of the conidia of 1.90.7 and 2.90.6 was about 1%. This low viability could have been the result of nuclear and or cytoplasmic damage. The average number of nuclei is 2—3 per macroconidium. If it is assumed that an undamaged nucleus is essential for conidial germination, then

with 1% viability, only one in 200—300 nuclei in the mycelium would be undamaged. Heterokaryotic complementation between damaged nuclei may mean that the presence of even one undamaged nucleus per conidium is not essential for germination. In that case the proportion of undamaged to damaged nuclei in the mycelium will be less than 1 in 200. Therefore either 99.5% of the nuclei in the mycelium carried irradiation damage serious enough to prevent conidial germination or radiation damage to the cytoplasm was partly responsible for the low viability. Throughout this paper the term damage refers to any event which prevented normal functioning of the nucleus or cytoplasm. The criterion of malfunction in both macroconidia and ascospores was failure to germinate. Thus the term damage includes both genetic and non-genetic defects induced by the ultraviolet irradiation since it is not possible to distinguish between them except by breeding tests.

Following a steady increase in sensitivity to ultraviolet in both the 90 second lines there was a large increase in 1.90.7 and 2.90.6. In fact, after a further exposure of 90 seconds neither 1.90.7 nor 2.90.6 produced a vegetative culture. This sudden increase in sensitivity was the result of the cumulative effect of the irradiation treatments. NORMAN (1951) reported that nuclear inactivation and lethal mutation played a part in the inactivation of *Neurospora* conidia by ultraviolet. Also GOODMAN (1958) reported that ultraviolet irradiation of *Neurospora* conidia can result in cytoplasmic inactivation in addition to nuclear inactivation and lethal mutation. It is known that functional complementation (BEADLE and COONRADT 1944; ATWOOD 1950; FINCHAM and PATEMAN 1957) between nuclei in heterokaryons occurs in *Neurospora*. In addition there is movement of the cytoplasm between cells in the mycelium. Consequently, *Neurospora* mycelium can carry a "load" of nuclear and cytoplasmic damage. This damage would probably be of at least three kinds, lethal mutation, nuclear inactivation and cytoplasmic inactivation. It seems clear that there is a sharp threshold value for this "load" which if exceeded prevents growth of the mycelium. Strains 1.90.7 and 2.90.6 carried almost the maximum "load" since a further exposure for 50 seconds (Table 4) drastically reduced the survival rate and a 90 second treatment prevented further growth.

The macroconidia from irradiated strains showed increased sensitivity to ultraviolet. This indicates that any selection for increased resistance was not effective under the experimental conditions. This result was unexpected. The experimental conditions were such that undamaged nuclei and cytoplasm would be expected to have a considerable selective advantage. GOODMAN (1958) reported that selection for resistance to ultraviolet in *Neurospora* was effective. A selected strain produced microconidia which were fifteen times as resistant to ultraviolet as the original. This shows that in *Neurospora* there is genetic variation with respect to ultraviolet resistance which can be exploited by selection. In the present work multinucleate macroconidia were used. It seems that heterokaryosis and cytoplasmic mixing in the multinucleate mycelium rendered ineffective any differential survival which may have occurred after irradiation. The nuclear and cytoplasmic components damaged by irradiation were apparently not replaced by undamaged components during growth of the mycelium.

The genetic analysis of the irradiated strains 1.90.5 and 2.90.5 was more complete than is usually possible. The most important result which emerged was the demonstration that a considerable degree of ascospore lethality could be attributed to cytoplasmic damage induced by ultraviolet light. A number of cases have been reported where ultraviolet radiation has apparently caused cytoplasmic damage. SARACHEK and TOWNSEND (1953) report disruption of mitochondria in yeast by ultraviolet. Differential irradiation of the nuclei and cytoplasm of *Habrobracon* eggs resulted in different survival kinetics (v. BORSTELL and MOSER 1956). GOODMAN (1958) on the basis of survival kinetics considers that cytoplasmic inactivation plays a part in the inactivation of *Neurospora* conidia by ultraviolet. This author also suggests that survival data published for a number of microorganisms indicates that ultraviolet radiation may cause cytoplasmic damage. In the work reported here the demonstration of cytoplasmic damage rests on the difference between reciprocal crosses. Moreover, the degree of nuclear damage, which resulted from the irradiation, was assayed simultaneously under the same experimental conditions. It is possible that the difference between reciprocal crosses was in fact due to nuclear damage which affected the female side of the reproductive system in such a way that the viability of the ascospore progeny was reduced. However it seems unlikely, to the author, that any nuclear damage affecting solely the efficiency of the female reproductive system would have delayed effects such as to result in a significant reduction of viability in apparently normal, well differentiated, ascospores.

There was a considerable difference in the amount of cytoplasmic damage in strains 1.90.5 and 2.90.5. This might have been the result of a difference in cytoplasmic sensitivity between the original strains 1 and 2. But this seems unlikely since both strains were single ascospore isolates from the same cross. The ascospore lethality due to cytoplasmic damage in 1.90.5 was considerable, approximately equal to that due to nuclear damage. This shows that cytoplasmic damage, while not significant at low levels of radiation, can be as important as nuclear damage at high levels. It is significant in this respect that in other work where cytoplasmic damage by ultraviolet has been shown or suspected the radiation level was high.

**Acknowledgements.** It is a pleasure to acknowledge the assistance of Dr. G. GREGORY, Statistics Department, University of Melbourne, who calculated the 95% confidence limits of the mean effects and the technical assistance of Mrs. E. SZEGO.

### Summary

1. Macroconidia of two strains of *Neurospora crassa* were given repeated exposures to ultraviolet light. Three levels of exposure, 10 seconds, 50 seconds and 90 seconds were used. At each treatment these exposures killed approximately 0%, 90% and 99% of the macroconidia respectively.

2. There was no significant change in viability or survival rate of the macroconidia after 6 successive exposures each of 10 seconds duration. After 7 successive exposures of 50 seconds there was a significant overall decrease in viability and in one of the strains a significant decrease in survival rate after irradiation. After 7 successive exposures to 90 seconds there was a significant decrease both in viability and survival rate.



3. After 5 successive exposures to ultraviolet, reciprocal crosses were made between all six irradiated lines and the original strains. Germination tests on the ascospores from these crosses provided estimates of the degree of ascospore lethality induced by the ultraviolet. In the 50-second lines an ascospore lethality of about 20% could be attributed to radiation damage to the nuclear material. In the 90-second lines about 30% ascospore lethality was due to radiation damage to the nuclear material. In addition about 20% ascospore lethality could be attributed to radiation induced cytoplasmic damage in one of the lines.

4. Some unexpected features of the results are discussed. An explanation is suggested for the observed increase in ultraviolet sensitivity of the irradiated strains.

### Literature

- ATWOOD, K. C.: The role of lethal mutations in the killing of *Neurospora* conidia by ultraviolet light. *Genetics* **35**, 95—96 (1950).
- BEADLE, G., and V. L. COONRADT: Heterocaryosis in *Neurospora crassa*. *Genetics* **29**, 291 (1944).
- BEADLE, G. W., and E. L. TATUM: Methods of producing and detecting mutations concerned with nutritional requirements. *Amer. J. Bot.* **32**, 678—686 (1945).
- BORSTELL, R. C. V., and H. MOSER: Differential ultraviolet irradiation of the *Habrobracon* egg nucleus and cytoplasm. In J. S. MITCHELL (edit.), *Progress in Radiobiology*, p. 211—215. London: Oliver and Boyd 1956.
- FINCHAM, J. R. S., and J. A. PATEMAN: Formation of an enzyme through complementary action of mutant alleles in separate nuclei in a heterocaryon. *Nature (Lond.)* **179**, 741—742 (1957).
- GOODMAN, F.: A study of the mechanism of resistance to ultraviolet light in a strain of *Neurospora crassa*. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 675—691 (1958).
- NORMAN, A.: Inactivation of *Neurospora* conidia by ultraviolet irradiation. *Exp. Cell Res.* **2**, 454—473 (1951).
- SARACHEK, A., and G. F. TOWNSEND: The disruption of mitochondria of *Saccharomyces* by ultraviolet irradiation. *Science* **117**, 31—33 (1953).
- WESTERGAARD, M., and H. K. MITCHELL: *Neurospora*. V. A synthetic medium favouring sexual reproduction. *Amer. J. Bot.* **34**, 573—577 (1947).

Dr. J. A. PATEMAN, Department of Genetics, Milton Road, Cambridge, England

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (Erwin-Baur-Institut) Köln-Vogelsang  
(Direktor: Prof. Dr. W. RUDOLF) and Department of Genetics, University of Wisconsin,  
Madison, Wisconsin

## EMBRYOLOGICAL INVESTIGATIONS ON THE FORMATION OF HAPLOIDS IN THE POTATO (*SOLANUM TUBEROSUM*)

By

K.-H. v. WANGENHEIM, S. J. PELOQUIN\* and R. W. HOUGAS\*

With 14 Figures in the Text

(Received November 3, 1960)

From crosses between tetraploid ( $2n = 48$ ) *S. tuberosum* (♀) and diploid ( $2n = 24$ ) *S. phureja* (♂), containing marker genes, HOUGAS and PELOQUIN (1960) have obtained 500 *S. tuberosum*-haploids ( $2n = 24$ ) from 31 different potato varieties and breeding stocks. Because of the practical and theoretical importance of this method (HOUGAS and PELOQUIN 1958b), it is desirable to know more about the embryological events which lead to the formation of these haploids. Furthermore this knowledge should give some information about the cause for seed failure in intraspecific crosses between diploids and polyploids (v. WANGENHEIM 1954, 1957), which is a common phenomenon in many plant families.

### Material and Methods

The cross between the potato variety "Merrimack" and a selected clone of P. I. 225 682 of *S. phureja* yielded the highest frequency of haploids (PELOQUIN, HOUGAS and GABERT 1960). Seed balls of this cross were opened 14 to 21 days after pollination (cut stem method, McLEAN and STEVENSON 1952) and generally only those ovules were fixed, which were obviously bigger than the majority of the ovules, which could be expected to have died already by this time after pollination.

For squash-preparations the ovules were fixed in alcohol-acetic acid 3:1 and stained with Feulgen and acetic orcein. For paraffin sectioning MÜNTZING's modification of NAVASHIN-KARPECHENKO was used as a fixative after a pre-treatment with alcohol-acetic acid. The sections were cut at  $20\ \mu$  and stained with crystal violet and light green. Usually there were many cell divisions in the endosperm, but few in the embryos. Thus the chromosome number of only little more than a third of the embryos could be counted. Where no good metaphases could be found, reliable counts of prophase were made with the aid of pencils of different colours for different optical levels. Since single ovules had been embedded, which were usually well-oriented, measurements of the approximate length could be made.

### Results

In squash preparations of 33 relatively big ovules from two seed balls, one ovule contained twin embryos without cell divisions, 13 ovules contained tetraploid embryos, 2 ovules contained single embryos with no cell divisions, and 17 ovules (51.5%) contained no embryo at all. The chromosome number of the endosperms could not be counted, possibly because of the advanced stage of development of the ovules (the embryos were already in the torpedo stage). Since the structure and type of endosperm cells could not be judged in squash preparations, more emphasis was placed on paraffine sectioned material.

\* Crops Research Division, ARS, USDA and the University of Wisconsin.

Some of the ovules, which had been fixed for paraffine embedding and were thought to have developed vigorously, contained a dead endosperm as is common in crosses between *S. tuberosum* (or artificial tetraploids) and diploids of *Solanum* (v. WANGENHEIM 1957), or in crosses between hexaploid *S. demissum* and diploid species (BEAMISH 1955, WALKER 1955). Sometimes parts of the embryos were still visible, surrounded by dead endosperm and meristematic endothelium (Fig. 1). As is shown in the Table, the average length of these ovules was smaller than that of those with a „living” endosperm, even though a few of the older ovules with a

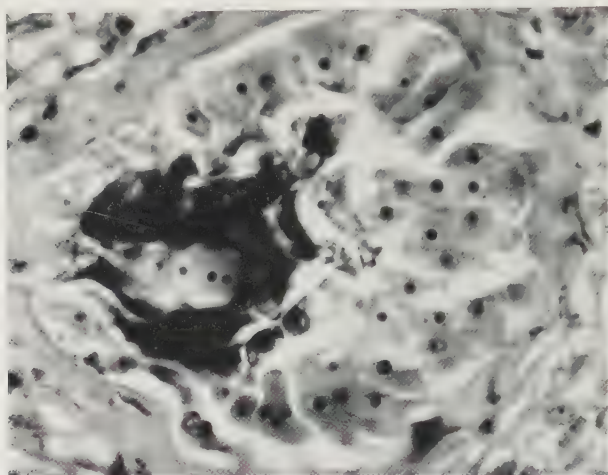


Fig. 1. Embryosac with part of the embryo, surrounded by dead endosperm (black) and expanding endothelium. 450 ×

dead endosperm were longer than the average length of ovules with „living” endosperm.

From 26 different seed balls, a total of 118 ovules with „living” endosperm were fixed for paraffine embedding. Nine of these seed balls contained no ovules with „living” endosperm at all, while the other 17 contained from 1 to 13. Considering that the seed ball usually contains up to 600 ovules (PELOQUIN unpublished) and many of these ovules

could have been fertilized, in the 26 seed balls examined by us the majority of the endosperms must have died. Thus only the exceptional cases had developed as far as this stage observed in preparations made 14 to 21 days after pollination.

The chromosome numbers of 97 endosperms have been counted. 96 of them were hexaploid and only one was pentaploid, though the latter constitution is expected in this type of cross. This suggests that the hexaploid constitution of the endosperm facilitates normal endosperm differentiation in this cross, while the pentaploid endosperm usually dies, as it did in the majority of the ovules.

A feature of younger stages in normal endosperm development was the presence of less vacuolized cells around the embryo and in the neighbourhood of the micropyle, and bigger and more vacuolized cells at the chalazal pole of the embryosac (Fig. 2). In the latter region the cell formation was often somewhat disturbed (Figs. 3, 4). One hexaploid endosperm was found, which was very similar to a normal nuclear endosperm with only a slight suggestion of cell walls and 12 pairs of nuclei simultaneously being in telophase (Figs. 10, 11), though the normal endosperm of *Solanum* is cellular from the beginning and the nuclei divide independent of each other. In some other endosperms huge nuclei were found and in one case two metaphase plates with about 12 chromosome sets (137 chromosomes were counted in one) were detected, while other nuclei of the same endosperm were hexaploid and the embryo tetraploid.



Fig. 2

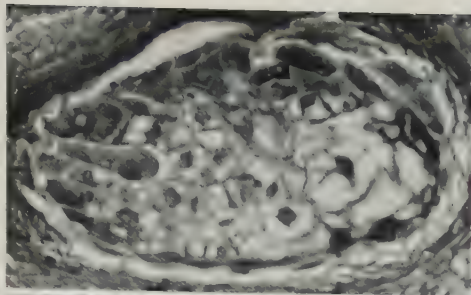


Fig. 3

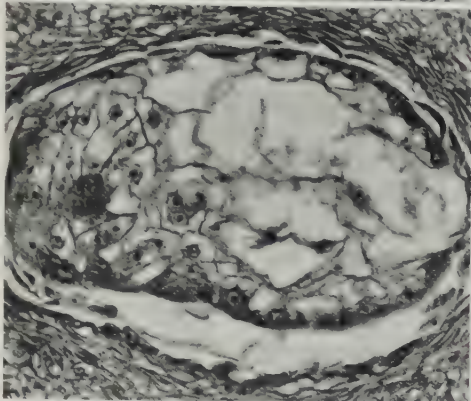


Fig. 4

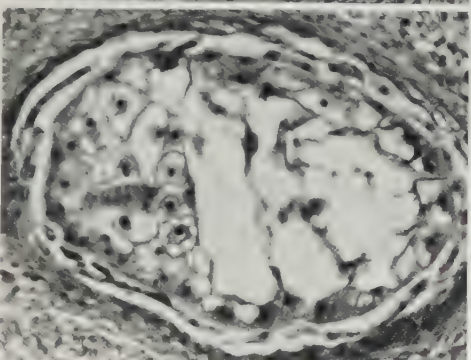


Fig. 5

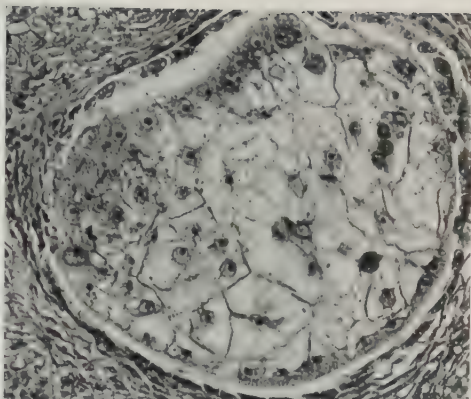
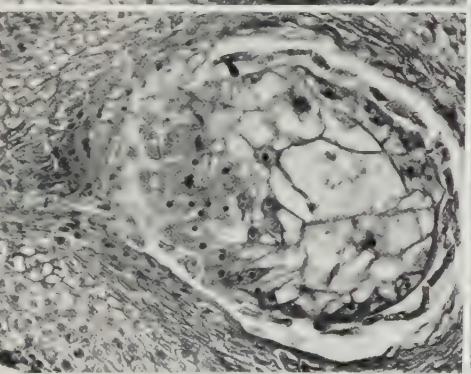


Fig. 6

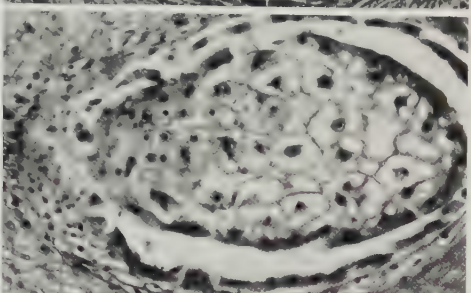


Fig. 7

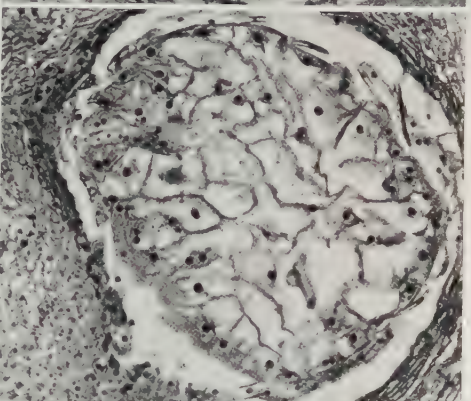


Fig. 8

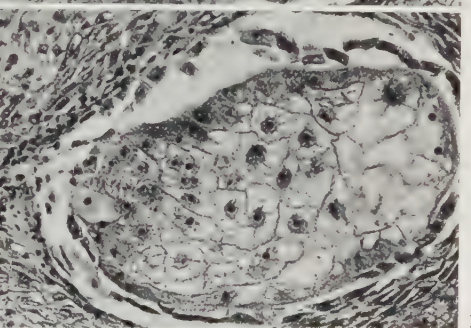


Fig. 9

Figs. 2—9. Fig. 2. Normal development of a tetraploid embryo and a hexaploid endosperm. The endosperm cells in the micropylar region are usually less vacuolized and smaller than at the chalazal pole. — Fig. 3. Tetraploid embryo and hexaploid endosperm. Abnormal big cells in the chalazal part of the endosperm. — Fig. 4. Tetraploid embryo and hexaploid endosperm. The cell wall formation is suppressed in more than half of the chalazal region of the endosperm. — Figs. 5—7. Hexaploid endosperms without embryos, normally differentiated with typically smaller cells in the micropylar portion and bigger cells in the chalazal portion; frequent cell divisions (Fig. 6). — Fig. 8 and 9. Normal development of hexaploid endosperms, with part of diploid embryos (suspensor, left). Figs. 2—9 160×

In 32 embryos the chromosome number was counted. One embryo, belonging to the pentaploid endosperm, was a triploid (Fig. 12). Intercellular gaps in the embryo, and big gaps in the middle of the endosperm, suggest that this ovule (in comparison to the one of Fig. 13 from the same seed ball) had slight disturbances during its development. 26 embryos were tetraploid (Figs. 2, 3, 4, 13) and five were diploid. 34 endosperms from complete series of sections contained no embryos at all.

The endosperms with no embryos (Figs. 5, 6, 7), as well as those which contained diploid embryos (Figs. 8, 9), differentiated usually quite normally with smaller and

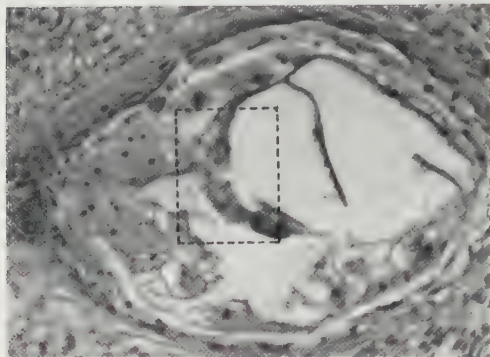


Fig. 10

Fig. 10. Hexaploid endosperm (embryo not visible). Cell wall formation is suppressed and a number of nuclei are dividing simultaneously. 170  $\times$

Fig. 11. Enlarged part of the endosperm of Fig. 10, showing four pairs of nuclei in telophase; no cell walls are formed. 750  $\times$



Fig. 11

less vacuolized cells at the micropylar end and bigger and more vacuolized cells at the opposite pole of the embryosac. Even the beginning of typical starch formation in the peripheral layers was found in an endosperm with no embryo in an advanced stage of development (Fig. 14). Also the average length of ovules with

Table. *Results from paraffine sections*<sup>1</sup>

	Ovules with dead endosperm	endo- sperm 6b embryo 4b	endo- sperm 6b embryo ?	endo- sperm ? embryo ?	endo- sperm 6b embryo 2b	endo- sperm 6b no embryo	endo- sperm ? no embryo	endo- sperm 5b embryo 3b
Number . . .	(76)	26	29	17	5	30	4	1
Approximate average length . . .	(0.298 mm)	0.455 mm				0.462 mm		(1 mm)

<sup>1</sup> Six ovules with hexaploid endosperm are not included because it was uncertain if the embryos had been lost with single sections. The number and size of "ovules with dead endosperm" do not represent the majority of ovules with dead endosperm, since generally only the biggest ovules had been fixed. In this Table, b = 12 = functional basic number.



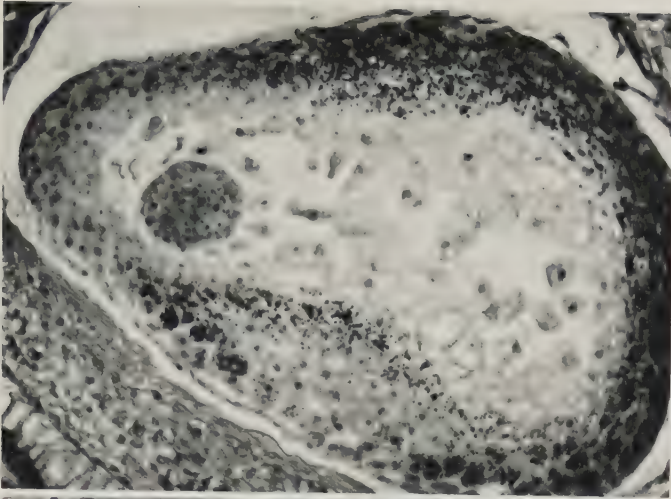


Fig. 12

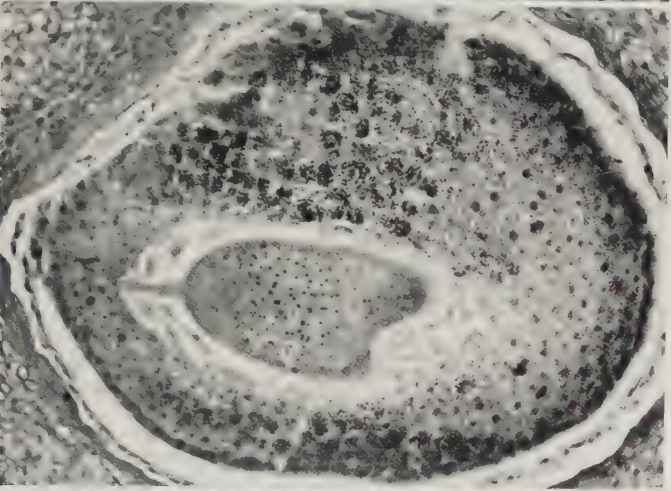


Fig. 13

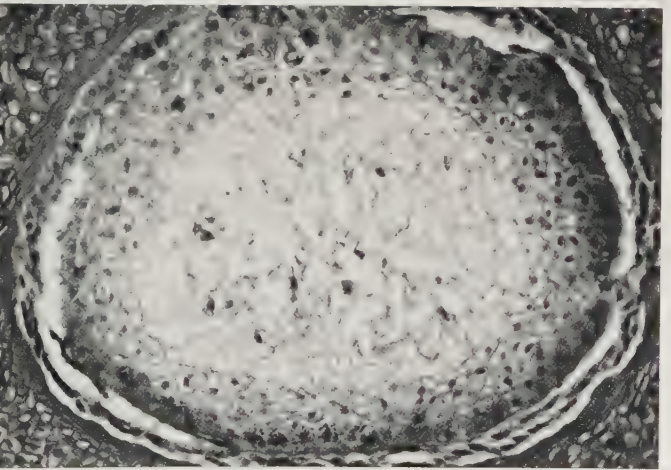


Fig. 14

Figs. 12—14. Ovules from the same seed ball, 108 $\times$ . Fig. 12. The only ovule with a triploid embryo and a pentaploid endosperm which was found "alive". — Fig. 13. Tetraploid embryo with hexaploid endosperm. The development is more regular than in the ovule shown in Fig. 12. — Fig. 14. Endosperm with no embryo. The development did not get as far as with the two ovules from the same seed ball (Figs. 12, 13), but the differentiation is normal with the beginning of starch formation in the peripheral cell layers. See lower part of the figure (black grains)



embryos and ovules with no embryos did not show any significant difference (Table). Thus the presence of the embryo does not have much influence on endosperm and seed development at least in younger stages. In advanced stages of development it might be different. In all the four biggest ovules with embryos (approximate length 1.0 [Fig. 12], 1.0, 0.9 [Fig. 13], and 0.7 mm), taken from the most advanced seed balls, the endosperm had begun with starch formation. In the corresponding four ovules with no embryos (approximate length 1.2, 1.0 [Fig. 14], 0.8 and 0.7 mm) only one endosperm (Fig. 14) just had begun with starch formation. But not enough paraffine sectioned material has been examined in this stage of development to conclude, that the embryo has some influence on endosperm development in advanced stages of development.

### Discussion

*Formation of haploids.* An endosperm, which develops normally at least to a certain extent, is a necessity for the development of the embryo. In this cross between a tetraploid female and a diploid male only a hexaploid endosperm seems to have a good chance to develop normally. Thus the union of the tetraploid secondary embryosac nucleus with two chromosome sets from the male, and the lack of fertilization of the egg cell, appear to be necessary for the formation of haploids of *S. tuberosum*. It seems likely that this occurred in the relatively high number of ovules with hexaploid endosperms in which the egg cell did not develop, probably because of the lack of fertilization and because certain conditions were not as favorable as they were in those cases where diploid embryos were found. The ovules with tetraploid embryos and hexaploid endosperms seem to have arisen by the function of unreduced pollen. This suggests that the embryoless endosperms (or the endosperms with diploid embryos) arose by the functioning of unreduced pollen, of which only one sperm united with the secondary embryosac nucleus, while the other failed to fertilize the egg. It is strange, however, that fertilization of the egg should have failed that often, compared to the relatively low frequency of unreduced pollen, and that tetraploids have never been reported to induce haploid potatoes, though their pollen might be expected to have the same possibility as unreduced pollen from diploids. The other possibility for the production of a hexaploid endosperm without fertilization of the egg cell might be that the chromosome sets of both the sperms of a reduced pollen grain in some way get into the secondary embryosac nucleus (e.g. by the formation of a restitution nucleus in the pollen tube division) and no sperm unites with the egg cell. This possibility ("double fertilization" of the secondary embryosac nucleus) is realized in several apomictic species with unreduced embryosacs but reduced pollen, according to RUTISHAUSER (1954). Certain disturbances in the pollen of the diploid pollinator are necessary which seem not always to be present. This might explain the difference in the haploid-inducing ability of different diploid clones of *S. phureja* (PELOQUIN, HOUGAS and GABERT 1960). The latter possibility may seem to be more likely because the vast majority of ovules in this cross die, if they are fertilized by reduced pollen, and the event, which leads to the union of both chromosome sets with the secondary embryosac nucleus does not need to occur very frequently.

Growing endosperms without embryos are known from several species (SMITH 1956, WEAVER 1957). Probably the unfertilized egg (if not undeveloped zygote)

does not develop in every case, depending on its own constitution, or on external influences. PELOQUIN, HUGAS and GABERT (1960) showed, that different varieties or breeding stocks react very differently to haploid induction by the same pollinator.

*Formation of triploids.* Occasionally (with respect to the number of ovules fertilized) triploid seedlings arise in intraspecific diploid  $\times$  tetraploid crosses in *Solanum* or in interspecific crosses like *S. tuberosum*  $\times$  *S. phureja*. One big ovule with a triploid embryo and a pentaploid endosperm (Fig. 12) was found and it is likely, that this ovule could have given rise to a triploid seedling, though it does not seem to have developed as normally as ovules with hexaploid endosperms are able to do (e.g., the one shown in Fig. 13, and which is from the same seed ball). Since the majority of ovules with this constitution died, the question arises, in what way pentaploid endosperms might be able to develop normally. However, not all hexaploid endosperms developed without disturbances. Endopolyploidy and suppressed cell wall formation was occurring, especially in the endosperm of Fig. 10 and 11. These features are the same as in tetraploid endosperms from intraspecific diploid  $\times$  tetraploid  $\times$  crosses and this may suggest, that certain changes (e.g. mutations or changes in the amount of extranuclear constituents on the female side) are occurring, which occasionally may give rise to normally growing pentaploid endosperms and triploid embryos, if such ovules are fertilized by reduced pollen from diploids. Similar changes in the "genomatic effectiveness" with respect to endosperm formation must have occurred (and are now fixed genetically) in the tetraploids *S. acaule* and *S. stoloniferum*, which behave like diploids in crosses with other *Solanum* species, e.g. the pentaploid endosperm in the cross *S. acaule* (tetraploid)  $\times$  *S. phureja* (diploid)  $\times$  develops normally, while the hexaploid endosperm in *S. acaule* (tetraploid)  $\times$  *S. tuberosum* (tetraploid)  $\times$  degenerates with the same features as in an intraspecific diploid  $\times$  tetraploid  $\times$ -cross (v. WANGENHEIM 1954, 1957). Interspecific differences in the "effectiveness of the genome" with respect to seed set (and endosperm formation) are known in other families also (*Brassica*, *Nasturtium*, HOWARD 1942, 1947; *Gossypium*, STEPHENS 1944, 1945; *Lycopersicon*, COOPER and BRINK 1945; *Primula*, VALENTINE 1953, 1956).

*Seed failure.* It is difficult to understand why seed failure due to endosperm degeneration occurs in crosses between diploids and tetraploids, even though the only difference between the parents needs to be quantitative (MÜNTZING 1930, 1933, WATKINS 1932). This means, that endosperm degeneration occurs also, if the parents contain identical chromosome sets but different numbers of them. It has been suggested, therefore, that the chromosome numbers of the maternal tissue, of the endosperm and of the embryo should be in the relation 2:3:2 (resp. 4:6:4). Changes in this relationship, due to different levels of ploidy of both parents, would cause degeneration of the endosperm with succeeding death of the embryo. However, the normal differentiation of hexaploid endosperms, whether the embryo is diploid, tetraploid, or lacking, shows that the normal differentiation of the endosperm, at least up to the observed stage of development and far beyond the usual time of endosperm degeneration, does not depend on an influence such as the chromosome number of the embryo. Since unreduced embryosacs in *Solanum* seem to be functioning preferentially in the diploid  $\times$  tetraploid  $\times$ -cross, it is also unlikely that maternal influences are important. This suggests,

that the reason for endosperm degeneration in these crosses is due to the constitution of the endosperm itself (v. WANGENHEIM 1954, 1957).

Also VALENTINE (1954) concluded from the origin of haploids in the cross *Primula veris* ♀ × *P. elatior* ♂ that seed development does not depend on a certain ratio between the chromosome number of the embryo and the endosperm. It is likely that these haploids arose in a similar way as in *Solanum*, since according to VALENTINE the diploid *Primula veris* acts more like a tetraploid with respect to seed formation ("genetic value 1.8") in comparison to the diploid *P. elatior* ("genetic value 1.0"). Thus in this cross the diploid secondary embryosac nucleus of *P. veris* together with two chromosome sets of *P. elatior* would have a good chance to form a normally developing endosperm.

### Zusammenfassung

Samenanlagen aus der Kreuzung *S. tuberosum* ( $2n = 48$ ) ♀ × *S. phureja* ( $2n = 24$ ) ♂, die sich weiter entwickelt hatten als die Mehrzahl der Samenanlagen dieser Kreuzung, wurden im wesentlichen an Hand von Schnittpräparaten, aber auch von Quetschpräparaten untersucht. Die Endosperme waren meistens hexaploid. Ungefähr ein Drittel von diesen enthielt entweder keine oder (in 5 Fällen) haploide ( $2n = 24$ ) Embryonen. Viele Embryonen waren tetraploid und nur in einem Fall wurde eine Samenanlage mit einem triploiden Embryo und einem pentaploiden Endosperm gefunden, obwohl diese Chromosomenzahlen für diese Kreuzung zu erwarten sind. Pentaploide Endosperme sterben gewöhnlich ab und verhindern dadurch die Entwicklung der Embryonen. Es ist deshalb zu vermuten, daß haploides *S. tuberosum* in der Weise entsteht, daß die Chromosomensätze beider Spermien eines reduzierten Pollenkornes auf irgendeine Weise in den sekundären Embryosackkern gelangen und so zur Entstehung eines hexaploiden Endosperms beitragen, das sich normal ausbildet und die Entwicklung der unbefruchteten Eizelle in einer Anzahl von Fällen ermöglicht. Die Befruchtung des sekundären Embryosackkerns durch unreduzierte Pollen und Ausfall der Befruchtung der Eizelle ist weniger wahrscheinlich, obwohl viele tetraploide Embryonen mit hexaploidem Endosperm auf Grund von unreduzierten Pollen entstanden zu sein scheinen. Es wurde gezeigt, daß das Endosperm sich unabhängig vom Embryo und dessen Chromosomenzahl bis weit über den üblichen Zeitpunkt der Endospermdegeneration hinaus normal entwickeln kann.

**Acknowledgements.** Our thanks are due to the W. K. Kellogg Foundation, Battle Creek, Michigan, the Ministry for Food, Agriculture and Forestry, Bonn, and Professor Dr. W. RUDOLF, Köln-Vogelsang, who granted a fellowship to one of us (K.-H. v. WANGENHEIM) at the University of Wisconsin, where the beginning of this investigation was made. The junior authors wish to acknowledge support of the National Science Foundation for this study. The German author is greatly indebted also to Dr. J. S. NIEDERHAUSER for his valuable help in preparing the preliminary manuscript in English on occasion of his stay at Köln-Vogelsang.

### Literature

- BEAMISH, K. I.: Seed failure following hybridization between the hexaploid *Solanum demissum* and four diploid *Solanum* species. *Amer. J. Bot.* **42**, 297—304 (1955).  
 COOPER, D. C., and R. A. BRINK: Seed collapse following matings between diploid and tetraploid races of *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Genetics* **30**, 376—401 (1945).  
 HOUGAS, R. W., and S. J. PELOQUIN: A haploid plant of the potato variety Katahdin. *Nature* (Lond.) **180**, 1209—1210 (1957).



- HOUGAS, R. W., and S. J. PELOQUIN: Haploids of the common potato. *J. Hered.* **49**, 103—106 (1958a).
- The potential of potato haploids in breeding and genetic research. *Amer. Potato J.* **35**, 701—707 (1958b).
- Initial evidence on the feasibility of potato breeding at the diploid level. *Amer. Potato J.* **37**, (1960).
- HOWARD, H. W.: The effect of polyploidy and hybridity on seed size in crosses between *Brassica chinensis*, *B. carinata*, amphidiploid *B. chinensis*—*carinata* and autotetraploid *B. chinensis*. *J. Genetics* **43**, 105—119 (1942).
- Seed size in crosses between diploid and autotetraploid *Nasturtium officinale* and allotetraploid *N. uniseriatum*. *J. Genetics* **48**, 111—118 (1947).
- MCLEAN, J. G., and F. J. STEVENSON: Methods of obtaining seed on Russet Burbank and similar-flowering varieties of potatoes. *Amer. Potato J.* **29**, 206—211 (1952).
- MÜNTZING, A.: Über Chromosomenvermehrung in *Galeopsis*-Kreuzungen und ihre phylogenetische Bedeutung. *Hereditas* (Lund.) **14**, 153—172 (1930).
- Hybrid incompatibility and the origin of polyploidy. *Hereditas* (Lund.) **18**, 33—55 (1934).
- PELOQUIN, S. J., R. W. HOUGAS and A. C. GABERT: The frequency of haploids in *Solanum tuberosum*. *Amer. Potato J.* **37** (1960).
- RUTISHAUSER, A.: Die Entwicklungserregung des Endosperms bei pseudogamen *Ranunculus*-Arten. *Mitt. Naturforsch. Ges. Schaffhausen* **25**, 1—45 (1954).
- SMITH, B. W.: *Arachis hypogaea*: Normal megasporogenesis and syngamy with occasional single fertilization. *Amer. J. Bot.* **43**, 81—89 (1956).
- STEPHENS, S. G.: Colchicine produced polyploids in *Gossypium*. I. An autotetraploid asiatic cotton and certain of its hybrids with wild diploid species. *J. Genetics* **44**, 272—295 (1944).
- II. Old world triploid hybrids. *J. Genetics* **46**, 303—312 (1945).
- VALENTINE, D. H.: Evolutionary aspects of species differences in *Primula*. *Symp. Soc. exp. Biol.* **7**, 146—158 (1953).
- Seed-incompatibility. *Proc. Int. Congr. Botany, Paris, Sect. X, 1954*, p. 170—171.
- Studies in British *Primulas*. V. The inheritance of seed compatibility. *New Phytologist* **55**, 289—388 (1956).
- WALKER, R. I.: Cytological and embryological studies in *Solanum*, Sect. *Tuberosum*. *Bull. Torrey bot. Club* **82**, 87—101 (1955).
- WANGENHEIM, K.-H. v.: Zur Ursache der Kreuzungsschwierigkeiten zwischen *Solanum tuberosum* L. und *S. acaule* BITT. bzw. *S. stoloniferum* SCHLECHTD. et BOUCHÉ. *Z. Pflanzenzücht.* **34**, 7—48 (1954).
- Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Chromosomenzahl und Kreuzbarkeit bei *Solanum*-Arten. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **88**, 21—37 (1957).
- WATKINS, A. E.: Hybrid sterility and incompatibility. *J. Genetics* **25**, 125—162 (1932).
- WEAVER, J. B.: Embryological studies following interspecific crosses in *Gossypium*. I. *G. hirsutum* × *G. arboreum*. *Amer. J. Bot.* **44**, 209—214 (1957).

Dr. K.-H. v. WANGENHEIM,

Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln-Vogelsang

Dr. S. J. PELOQUIN, Assistant Professor,

Dr. R. W. HOUGAS, Associate Professor,

University of Wisconsin, Department of Genetics, Madison 6, Wisconsin, U.S.A.

AKZESSORISCHE CHROMOSOMEN BEI *ACHILLEA*:  
AUSWIRKUNGEN AUF DAS FORTPFLANZUNGSSYSTEM,  
ZAHLEN-BALANCE UND BEDEUTUNG FÜR DIE MIKRO-EVOLUTION  
(ZUR PHYLOGENIE DER GATTUNG *ACHILLEA*, VI.)

Von

FRIEDRICH EHRENDORFER

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. September 1960)

A. Einleitung

Im Rahmen der Untersuchungen über die Bedeutung von akzessorischen Chromosomen (akz. Chrom.) für die Mikro-Evolution bei diploiden und polyploiden Sippen von *Achillea* wurde im Beitrag V (EHRENDORFER 1960a) besonders die cytologische Seite des Problems behandelt. Die vorliegende Arbeit berücksichtigt vor allem in diesem Zusammenhang wesentliche genetische Fragen:

1. Welche Auswirkungen haben akz. Chrom., besonders im Rahmen des Fortpflanzungssystems (Kompatibilität, Fertilität, Pollenschlauch- und Eizellenentwicklung)?

2. Besteht eine Zahlen-Balance akz. Chrom. in den Populationen und wie kommt sie zustande?

3. Welche Schlußfolgerungen sind im Hinblick auf eine allfällige Bedeutung der akz. Chrom. in der Mikro-Evolution möglich?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden reziproke Kreuzungen zwischen den diploiden Kleinarten *Achillea asplenifolia* (mit und ohne akz. Chrom.) und *A. setacea* (ohne akz. Chrom.) durchgeführt. Die resultierenden  $F_1$ -Hybriden mit verschiedenen Zahlen von akz. Chrom. (0—6) wurden gleichzeitig mit Pollen diploider Geschwisterpflanzen und pentaploider Hybriden bestäubt. Die Nachkommenschaften wurden getrennt aufgezogen und cytologisch analysiert. Aus den Ergebnissen konnte versucht werden, den Einfluß der akz. Chrom. auf die Kreuzungskompatibilität, Fertilität, Pollenschlauchkonkurrenz und die Produktion reduzierter und unreduzierter Eizellen zu erfassen. Ein Vergleich der Parental-,  $F_1$ - und  $F_2$ -Generation sollte weiterhin Aufschluß über die Zahlen-Balance akz. Chrom. in einer experimentellen Population geben.

B. Material und Methodik

Im Hinblick auf Kulturbedingungen, Kennzeichnung der Pflanzen und cytologische Methoden sei auf EHRENDORFER 1960a verwiesen.

Bei den Kreuzungsversuchen mit den diploiden *A. asplenifolia* (*a*) und *A. setacea* (*s*) wurden jeweils  $\pm$  äquivalente Sammel-Infloreszenzen (100—200 Blütenköpfchen) der Mutterpflanzen vor dem Aufblühen in Pergaminsäckchen eingebeutelt und während der Blütezeit in Abständen von 1—2(—3) Tagen mit abgeschnittenten Blütenköpfchen der Vaterpflanzen bestäubt. Emaskulation erfolgte dabei nicht, da weitgehende Selbststerilität vorliegt (EHRENDORFER, unveröff.) und die Nachkommenschaften jeweils auf ihre hybridogene Herkunft überprüft wurden.

Durch die Verwendung einer Pflanze von *a* mit labiler Zahl akz. Chrom. in den Gameten war die Herstellung von in der Zahl der akz. Chrom. stark variablen, sonst aber idiotypisch

weitgehend einheitlichen reziproken  $F_1$ -Serien ( $s \times a$ : Serie 64,  $a \times s$ : Serie 72) möglich. Von diesen Serien wurden 25 Individuen einer sehr eingehenden cytogenetischen Analyse unterzogen.

Weiters wurde in den Jahren 1954—1957 folgender Isolationstest durchgeführt: Auf eine kleine, etwa  $10 \times 15$  m messende, von anderen *Achillea*-Kulturen weit entfernte und durch Baumgruppen isolierte Kulturlfläche im Hostischen Garten des Botanischen Gartens der Universität Wien wurden im Jahre 1954 diploide  $F_1$ -Individuen der Serien 64 und 72 (größtenteils mit akz. Chrom.) und pentaploide  $F_1$ -Individuen [Kombination *A. collina* (4x) und *A. millefolium* (6x); ohne akz. Chrom.] durcheinander ausgepflanzt. In der durch Klima-Extreme nicht beeinträchtigten Vegetationsperiode 1956 kamen die Individuen dieser isolierten experimentellen Population zum freien Abblühen. Infolge der langen und weitgehend gleichzeitigen Blühperiode der diploiden und pentaploiden  $F_1$ , wegen der durchschnittlich ausgezeichneten Pollenproduktion aller  $F_1$  und wegen der reichlichen Anwesenheit von Blütenbesuchern war eine gleichmäßige Bestäubung der diploiden Mutterpflanzen mit Pollen der umstehenden diploiden und pentaploiden Vaterpflanzen gewährleistet. Nach Abschluß der Blühperiode 1956 wurden die Sammel-Infloreszenzen von 25 zufallsgemäß ausgewählten diploiden  $F_1$ -Mutterpflanzen eingebeutelt und nach völligem Ausreifen zur Bestimmung der Fertilität herangezogen. Aus äquivalenten Köpfchenzahlen von 19 Individuen dieser  $F_1$  gelangten im Jahre 1957  $f_2$ -Nachkommenschaften zur Weiterzucht; davon wurden 300 zufallsgemäß ausgewählte  $f_2$ -Individuen cytologisch analysiert.

### C. Auswirkungen auf die Kreuzungskompatibilität von *Achillea asplenifolia* und *A. setacea*

Bei experimentellen Kreuzungsversuchen zwischen den beiden diploiden Kleinarten *A. setacea* ( $s$ ) und *A. asplenifolia* ( $a$ ) konnten bei Verwendung verschiedener Ausgangsindividuen aus niederösterreichischen und burgenländischen Populationen aus 10 Kombinationen regelmäßig  $s \times a$ - $F_1$  hergestellt werden; dabei war es gleichgültig, ob  $a$  mit oder ohne akz. Chrom. zur Verwendung kamen. Die reziproke  $F_1$ -Kombination  $a \times s$  gelang dagegen *nur* bei Verwendung von  $a$  mit akz. Chrom. Aus mehr als 100  $F_1$ -Paarungen geht weiter hervor, daß Nachkommenschaften fast ausschließlich aus Kombinationen entstehen, bei denen zumindest eines der Ausgangsindividuen akz. Chrom. führt. (In der resultierenden  $F_2$  gibt es dann aber auch gelegentlich Individuen ohne akz. Chrom.!) Bloß in einem Fall [ $\times 58/19 + 20$ : ( $a \times s$ )  $\times$  ( $s \times a$ )] konnten  $F_2$  erzielt werden, obwohl keine der beiden  $F_1$ -Ausgangspflanzen akz. Chrom. aufwies.

Diese Ergebnisse legen die Annahme nahe, daß akz. Chrom. unter Umständen eine Pufferwirkung auf die partielle Kompatibilitätsbarriere zwischen *A. asplenifolia* und *A. setacea* sowie auf Sterilitätserscheinungen bei den Nachkommenschaften ausüben. Diese Abpufferung ist möglicherweise auf  $\pm$  weitgehende Aufhebung bestimmter Hemmfaktoren des Pollenschlauchwachstums durch akz. Chrom. in den Mutterpflanzen zurückzuführen (vgl. Abschnitt E, 3).

### D. Auswirkungen auf Vitalität und Morphologie der $F_1$

Bei länger andauernder Kultur am gleichen Standort machen sich bei *Achillea* nach 2—3 Jahren gewisse Erschöpfungserscheinungen bemerkbar, denen besonders schwächliche Individuen bald zum Opfer fallen. Bei den in Tabelle 1 genannten 25  $F_1$ -Pflanzen war von 1954—1958 die starke Eliminierung der Individuen mit 1 bzw. mit 4 bis mehr akz. Chrom. auffällig, während die Pflanzen mit 0, 2 und 3 akz. Chrom. relativ gut abschneiden. Das Verhältnis abgestorbene:lebende Individuen war für die beiden Gruppen 7:1 bzw. 9:8. Es ist bemerkenswert, daß



sich eine entsprechende Gruppierung auch für die Beziehung: Zahl akz. Chrom. — Fertilität ergibt.

In morphologischer Hinsicht bestehen innerhalb der Serien 64 und 72 zwischen Pflanzen mit verschiedenen Zahlen von akz. Chrom. keine merklichen äußeren Unterschiede.

## E. Auswirkungen auf Fertilität und Nachkommenschaft der $F_1$

### 1. Fertilität

An 25 frei abblühenden  $F_1$ -Individuen der reziproken Serien  $s \times a$ : 64 und  $a \times s$ : 72 wurden im Frühsommer 1956 (parallel zu den im folgenden Abschnitt

Tabelle 1. *Fertilitäts-Indices: normale Achänen pro Köpfchen (1) und Keimlinge pro Köpfchen (2) für  $F_1$ -Pflanzen der reziproken Kombinationen  $s \times a$  und  $a \times s$ , Mittelwerte für Individuengruppen mit gleicher Primärzahl (Pz) akzessorischer Chromosomen.* (Weitere Erklärungen im Text)

	akz. Chrom. (Pz)	$F_1$ Indivi- duen- Nummern	Fertilität			
			Sa/Kö (1)	Kei/Kö (2)	Mittelwerte	
					(1)	(2)
$s \times a$ : Serie 64	0	12 13	0,25 0,56	0,35 0,58	} 0,41	0,47
	2	11	1,31	1,12		(1,31) (1,12)
	0	118	4,75	5,88	(4,75)	(5,88)
$a \times s$ : Serie 72	1	113	0,09	0,02	} 0,16	0,14
		114	0,51	0,45		
		131	0,02	0,02		
		134	0,03	0,07		
	2	122	2,14	1,20	} 1,86	1,44
		129	3,89	3,21		
		135	1,09	0,57		
		137	0,39	0,38		
		139	0,79	0,38		
		143	1,64	1,05		
		147	1,97	1,65		
	3	149	3,73	3,89	} 0,38	0,35
		150	1,12	0,64		
		120	0,53	0,49		
		138	0,56	0,59		
	4—6	144	0,14	0,07	} 0,38	0,26
		145	0,30	0,25		
		119	0,55	0,25		
		121	0,26	0,26		
		127	0,18	0,11	} 0,38	0,26
		128	0,53	0,40		

ist diese starke Amplitude der Fertilität (trotz völlig gleichartigen Kulturbedingungen!) wohl im wesentlichen auf diverse idiotypische Komponenten zurückzuführen.

Plasmatische Unterschiede sind vielleicht für das auffällig verschiedene Verhalten der Individuen ohne akz. Chrom. aus den reziproken Serien  $s \times a$ : 64—12,13

geschilderten  $f_2$ -Testen)

Fertilitätsbestimmungen durchgeführt. Dazu wurde von jedem Individuum der Inhalt einer bestimmten Zahl von Köpfchen (jeweils 50—100) von verschiedenen Zweigen der Infloreszenz unter dem Binokular auf die Anzahl äußerlich normal erscheinender Achänen geprüft und dann unter Glashausbedingungen einer Keimprobe unterzogen. Die Ergebnisse aus den nach Hybridkombination und der Primärzahl akz. Chrom. geordneten  $F_1$ -Pflanzen (vgl. EHRENDORFER 1960a, Tabelle 2) sind in Tabelle 1 dargestellt.

Gegenüber den Ausgangssippen ergibt sich für die  $F_1$ -Hybriden mit Indices von 0,02—5,88 sehr stark bis mäßig gesenkte Fertilität. Da die Chromosomenpaarung in der Pollenmeiose bei allen Individuen praktisch ungestört abläuft (SCHNEIDER 1958),

und  $a \times s$ : 72—118 verantwortlich. Genische bzw. kryptostrukturelle Verschiedenheiten — bedingt durch Heterozygotie der Parentalpflanzen — liegen offenbar den Schwankungen innerhalb bestimmter Klassen von akz. Chrom.-Zahlen zugrunde (etwa bei Serie 72, 2 akz. Chrom.: 129, 149 und 137, 139!). Trotz der dadurch bedingten starken Streuung kann beim Vergleich der  $a \times s$ -Serien auch noch ein ausschlaggebender Einfluß der Zahl der akz. Chrom. auf die Fertilität belegt werden. Dies geht aus der statistischen Sicherung der Differenzen zwischen den Mittelwerten des Fertilitätsindex (2) für Schwesternpflanzen der Serie 72 hervor:

Tabelle 2. Differenzen zwischen den Mittelwerten des Fertilitäts-Index (Keimlinge pro Köpfchen) für bestimmte Klassen von akz. Chrom.-Zahlen innerhalb der  $F_1$ -Serie 72

	akz. Chrom. (Pz)	$F_1$ n	Fertilität Kei/Kö		Differenzen				
			$M$ (2)	$\pm m$	$D$	$\pm m_D$	$t$	FG	$P$
$a \times s$ : 72	1	4	0,140	$\pm 0,104$	1,301	$\pm 0,438$	2,97	11	$< 0,02$
	2	9	1,441	$\pm 0,426$					
	3 + 4 — 6	8	0,303	$\pm 0,064$	1,138	$\pm 0,430$	2,65	15	$< 0,02$

Demnach ist die relativ gute Fertilität der  $F_1$ -Pflanzen mit 2 akz. Chrom. ( $M = 1,44$ ) gegenüber der stark gesenkten Fertilität der  $F_1$ -Pflanzen mit 1 ( $M = 0,14$ ) und 3 + 4 — 6 ( $M = 0,35$ ) akz. Chrom. gesichert. Auffällig ist die gute Fertilität der einen  $F_1$ -Pflanze ohne akz. Chrom. ( $118 = 5,88$ ). — Bei der  $F_1$ -Serie  $a \times s$ —72 erfahren demnach Individuen mit 1 und 3 bis mehr akz. Chrom. besonders starke Fertilitätssenkungen. Die vorliegenden Daten zeigen, daß der Einfluß der akz. Chrom. je nach Konstitution von Plasmon und Genom verschieden ist, also nur eine von mehreren variablen Komponenten in der Fertilitätsregulierung darstellt.

## 2. Nachkommenschaften nach Bestäubung mit Pollen diploider und pentaploider Vaterpflanzen

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse des Isolationsversuches (wegen der Methodik vgl. S. 401) mit diploiden *A. asplenifolia*—*A. setacea*- $F_1$ -Hybriden ( $2n = 18$ , größtenteils mit akz. Chrom.) und pentaploiden *A. collina*—*A. millefolium*- $F_1$ -Hybriden ( $2n = 45$ , ausnahmslos ohne akz. Chrom.) im Hinblick auf die Ergebnisse bei den Diploiden darzustellen. Nach der Anlage des Versuches waren für die diploiden  $F_1$ -Mutterpflanzen Bestäubungsmöglichkeiten gleichermaßen durch diploide Schwesternpflanzen wie auch durch pentaploide  $F_1$ -Pflanzen gegeben; Selbstbefruchtung kommt bei den Diploiden kaum in Frage (EHRENDORFER, unveröff.). — Aus den resultierenden 19  $f_2$ -Nachkommenschaften der diploiden  $F_1$  wurden 300 Jungpflanzen cytologisch untersucht.

Die Ergebnisse der cytologischen Analyse der 300  $f_2$ -Individuen sind, den entsprechenden Mutterpflanzen zugeordnet, in Tabelle 3 zusammengefaßt worden. Aus der Verteilung der  $2n$ -Zahlen für die einzelnen  $f_2$ -Pflanzen ergeben sich drei klar getrennte Gruppen:

I.  $2n = 18$ : 196 Individuen,  $2n = 19$ : 6 Individuen und  $2n = 20$ : 1 Individuum, zusammen 203 Individuen; zusätzlich zu den Normalchromosomen jeweils 0—6 akz. Chrom. (Abb. 1a).

II.  $2n = 27-32^1$ : 27 Individuen, häufigste  $2n$ -Zahl ist 29; zusätzlich jeweils 0—4 akz. Chrom. (Abb. 1b).

III.  $2n = 36-49^1$ : 70 Individuen, häufigste  $2n$ -Zahl ist 41; zusätzlich jeweils 0 oder eine gerade Zahl von akz. Chrom.: 2, 4, 6 (Abb. 1c).

Aus dieser Verteilung der Chromosomenzahlen lassen sich folgende Schlußfolgerungen über die Entstehung der diversen  $f_2$ -Individuen ziehen:

a) *Gruppe I* besteht aus Individuen, die aus reduzierten Eizellen der diploiden Mutterpflanze und reduziertem Pollen einer diploiden Vaterpflanze entstanden

sind ( $2R \times 2$ ,  $2n = 9 + 9$ ); die Pflanzen mit 1 bzw. 2 überzähligen Normalchromosomen sind aus aneuploiden Gameten entstanden (mangelhafte Syndese der Meiose-Chromosomen, vgl. EHRENDORFER 1959a).

b) *Gruppe II* besteht aus Individuen, die aus reduzierten Eizellen der Mutterpflanze und reduziertem Pollen einer pentaploiden Vaterpflanze entstanden sind ( $2R \times 5$ ,  $2n = 9 + 18-23$ ); die akz. Chrom. stammen ausschließlich von der Mutterpflanze.

c) Auch die 4  $f_2$ -Individuen mit  $2n = 27$  sind *nicht* aus einer diploiden unreduzierten Eizelle und einem reduzierten Pollen einer Diploiden ( $2UR \times 2$ ,  $2n = 18 + 9$ ), sondern aus einer reduzierten Eizelle einer Diploiden und einem chromosomal sehr stark herunterregulierten Pollen einer Pentaploiden entstanden. Das wird durch das Vorkommen von Pollen mit  $n = 18$  bei den Pentaploiden und

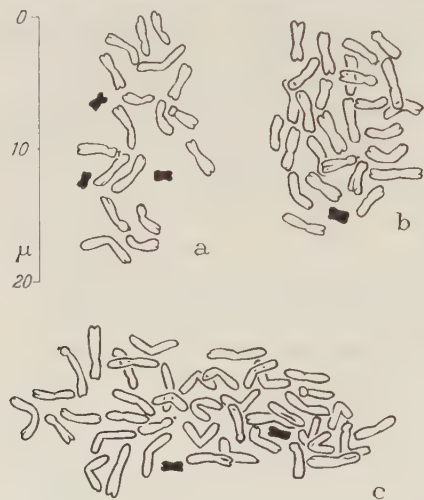


Abb. 1a—c. Akzessorische Chromosomen in C-Mitosen des Wurzelspitzenbereiches von  $f_2$ -Pflanzen aus  $a \times s$ - und  $s \times a$ -F<sub>1</sub>: a  $2n = 18 + 3$  akz. Chrom.,  $2R \times 2$  (72—143—26), b  $2n = 27 + 1$  akz. Chrom.,  $2R \times 5$  (72—139—20), c  $2n = 42 + 2$  akz. Chrom.,  $2UR \times 5$  (64—11—5). (Weitere Erklärungen im Text)

durch die Zahl der akz. Chrom. bei den fraglichen  $f_2$ -Pflanzen belegt (unter anderem 2 Individuen mit  $2n = 27 + 1$  akz. Chrom. — Abb. 1b —, was bei UR mit verdoppeltem  $n$ -Chromosomensatz nicht möglich wäre).

d) Demzufolge sind Triploide aus der Kombination  $2UR \times 2$  ( $2n = 18 + 9$ ) bei den in Frage stehenden Spezies-Hybriden nicht lebensfähig; diese Schlußfolgerung wird auch durch zahlreiche — im Hinblick auf die Entstehung von Triploiden — ergebnislose Kreuzungsversuche  $2x \times 4x$  und  $4x \times 2x$  unterstrichen (EHRENDORFER, unveröff.).

e) *Gruppe III* — durch eine auffällige Zäsur der  $2n$ -Zahlen von II getrennt — besteht im wesentlichen aus Individuen, die aus unreduzierten diploiden Eizellen und reduziertem Pollen pentaploider Vaterpflanzen entstanden sind ( $2UR \times 5$ ,  $2n = 18 + 19-31$ ). Diese Deutung wird durch die ausschließlich *gerade* Zahl akz. Chrom. und durch das Fehlen jeglicher Hinweise auf die Funktion unreduzierter Pollenschläuche (die ja  $\pm 45$  Chromosomen haben müßten!) klar bewiesen.

<sup>1</sup> Genauere Angaben werden in einem folgenden Beitrag veröffentlicht werden.



(2 = diploid, 5 = pentaploid, R = reduzierte, UR = unreduzierte Eizelle) und Primärzahl (Pz) akz. Chrom. geordnet. (Weitere Erklärungen im Text)

F <sub>1</sub>		Anzahl von f <sub>2</sub> -Individuen																	
akz. Chrom. (Pz)	Individuen-Nummern	n	2R × 2 (I)						2R × 5 (II)				2UR × 5 (III)						
			akz. Chrom. (Pz)						akz. Chrom. (Pz)				akz. Chrom. (Pz)						
			0	1	2	3	4	5	6	0	1	2	3	4	0	2	4	6	
0	12	13		2	1					3	5				5			5	
	13	18													17			17	
2		31		2	1					3	5				22			22	
	11	7			1					1	1					5		5	
		7			1					1	1					5		5	
		38		2	2					4	5	1			6	22	5	27	
0	118	20	7	11	1		1			20									
		20	7	11	1		1			20									
1	113	26		3	3	6	5		1	18	2	3		1	6	1		2	
	114	22		7	9	1	1			18	1				1	3		3	
	131	2				1				1						1		1	
	134	8		2	3	1		1		7						1		1	
2		58		12	15	8	6	2	1	44		3	3		7		6	7	
	122	21	2	5	7	4	2			20	1				1				
	129	26	2	16	8					26									
	137	20		3	10	1				14						6		6	
3		23		2	11	6				19	4				4		3		
	143	27		6	11	6			1	23	1				1	3		3	
	149	7		1	4	1				7									
		124	4	33	51	18	2	1		109		6				6		9	
3	120	21		7	4	3	2			14		1			1	5	1	6	
	145	12		7						9		1	1		2	1	1	1	
4-6		33		14	4	3	2			23		1	2		3		5	2	
		7		1						1							5	1	
	121	6		1						1	2	1			3	2	1	3	
	127	14	1	1						2	2				2	4	5	9	
Total		27	1	2						3	4	1				6	11	18	
		262	12	72	71	29	11	3	1	199	4	11	5	—	1	21	6	41	
		300								203					27			68	

a × s: Serie 72

s × a: Serie 64

f) Gruppe III enthält aber — mit 2 Individuen  $2n = 36$  und 0 bzw. 4 akz. Chrom. aus den  $f_2$ -Serien 11 und 128 — auch noch Allotetraploide mit der Formel  $2(2R \times 2)$ ,  $2n = 2(9 + 9)$ ; daß es sich hier nicht um Produkte aus  $2UR \times 5$  mit stark herunterregulierter Chromosomenzahl handelt, kann nach experimenteller Herstellung einer Allotetraploiden aus der Kreuzung zweier diploider  $F_1$ -Pflanzen der gleichen Serie und wegen der höheren Chromosomenzahlen in  $5x/2$  Pollenschläuchen bei Befruchtung von unreduzierten Eizellen als wahrscheinlich gelten.

Damit ergeben sich für das gesamte  $f_2$  Material folgende Verhältnisse:

			Vater	
			$2x$	$5x$
Mutter $2x$	Eizelle	reduziert	$2R \times 2 \rightarrow$ (I)	$2(2R \times 2)$
		unreduziert	$2UR \times 2$ (nicht lebensfähig)	$2R \times 5$ (II)
				$2UR \times 5$ (III)

Die Anordnung der Tabellen 3 und 4 entspricht diesen Schlußfolgerungen. Die Unterschiede zwischen den diversen  $f_2$ -Nachkommenschaften im Hinblick auf die prozentuelle Beteiligung von  $2R \times 2$ ,  $2R \times 5$  und  $2UR \times 5$  sind augenscheinlich. Die völlig gleichartigen Bedingungen für die  $F_1$ -Mutterpflanzen und die  $f_2$ -Nachkommen schließen modifizierende Umwelteinflüsse als Ursachen dafür aus. Die Unterschiede zwischen den diversen  $f_2$ -Serien müssen demnach auf die differenzierende Wirkung idiotypisch verschiedener  $F_1$ -Mutterpflanzen zurückgeführt werden. Abgesehen von der allgemeinen und wahrscheinlich erst frühembryonalen Eliminierung der triploiden  $2UR \times 2$ -Zygoten muß diese Differenzierung im wesentlichen schon während Pollenschlauchwachstum, Embryosackentwicklung, eventuell auch schon während der Befruchtung — also in der Haplophase — erfolgen. Eine diplophasische Differenzierung zwischen  $2R \times 2$ -,  $2R \times 5$ - und  $2UR \times 5$ -Embryonen müßte auch in einer unterschiedlichen Vitalität zumindest der Jungpflanzen erkennbar sein; dies ist aber ebensowenig wie bei Altpflanzen der Fall. Weiteren Überlegungen kann daher die These zugrunde gelegt werden:

unterschiedliche idiotypische Konstitution der  $F_1$ -Mutterpflanzen

↓

unterschiedliche Entwicklung der ♂ und ♀ Gametophyten

↓

unterschiedliche  $f_2$ -Nachkommenschaften

Durch Vergleich der verschiedenen  $f_2$ -Serien soll versucht werden, die verschiedenen Komponenten (Plasmon, Genom, akz. Chrom.) dieser idiotypischen Unterschiede der entsprechenden  $F_1$ -Mutterpflanzen mehr-minder voneinander zu isolieren und ihre Auswirkungen auf die Entwicklung der  $n$ -Generation klarzulegen.

### 3. Pollenschlauchkonkurrenz

Beim Vergleich der verschiedenen  $f_2$ -Nachkommenschaften ergeben sich auffällige Unterschiede in der prozentuellen Verteilung von Individuen mit diploiden

Tabelle 4. Zusammenfassung der Ergebnisse des Isolationstestes entsprechend Tabelle 3 ohne Berücksichtigung der akz. Chrom.-Zahlen der  $f_2$ -Anteile (I—III), Verhältnisse und Prozentangaben (A—C) von reduzierten (R) bzw. unreduzierten (UR) Eizellen und diploiden (2) bzw. pentaploiden (5) Vaterpflanzen bei der Entstehung von 298  $f_2$  aus 19  $F_1$ . (Weitere Erklärungen im Text)

	$F_1$		$f_2$						
	akz. Chrom. (Pz)	Individuen-Nummern	n	(I) 2R × 2	(II) 2R × 5	(III) 2UR × 5	(A) 2R × 5 : 2R × 2 + 2R × 5	(B) 2UR × 5 : 2R × 5 + 2UR × 5	(C) 2R × 5 + 2UR × 5 : $f_2$ -total
$s \times a$ : Serie 64	0	12	13	3	5	5	5:8	22:27	27:30
		15	17	0	0	17			
			30	3	5	22	62,5%	81,5%	90,0%
	2	11	7	1	1	5	1:2	5:6	6:7
			7	1	1	5	50,0%	83,3%	85,7%
			37	4	6	27	60,0%	81,8%	89,2%
$a \times s$ : Serie 72	0	118	20	20	0	0	0:20	0:0	0:20
			20	20	0	0	0,0%	0,0%	0,0%
	1	113	26	18	6	2	7:51	7:14	14:58
		114	22	18	1	3			
		131	2	1	0	1			
		134	8	7	0	1			
			58	44	7	7	13,7%,	50,0%,	24,1%
	2	122	21	20	1	0	6:115	9:15	15:124
		129	26	26	0	0			
		137	20	14	0	6			
		139	23	19	4	0			
		143	27	23	1	3			
		149	7	7	0	0			
			124	109	6	9	5,2%	60,0%	12,1%
	3	120	21	14	1	6	3:26	7:10	10:33
		145	12	9	2	1			
			33	23	3	7	11,5%	70,0%	30,3%
	4—6	121	7	1	0	6	5:8	18:23	23:26
		127	6	0	3	3			
		128	13	2	2	9			
			26	3	5	18	62,5%	78,3%	88,5%
			261	199	21	41	9,5%	66,1%	23,8%

bzw. pentaploiden Vätern (Tabelle 4, Spalten I—II, A). Wie schon S. 406 festgestellt wurde, müssen diese Unterschiede auf unterschiedliche Beeinflussung der Gametophyten durch die  $F_1$ -Mutterpflanzen zurückgeführt werden. Diese Beeinflussung erfolgt dabei *nicht* direkt durch die Eizellen und durch selektive Befruchtung: Die Durchschnittszahlen von akz. Chrom. in Eizellen, die durch Pollenschläuche von 2x- bzw. 5x-Vätern befruchtet wurden, stimmen nämlich fast überein:  $M = 0,8$  bzw.  $0,75$  akz. Chrom. [Diese Werte stammen von 203 diploiden und 95 polyploiden  $f_2$ -Individuen (Tabelle 3 und 8); der Wert für die Eizellen der diploiden Kombination  $2R \times 2$  ergibt sich nach Abzug der durchschnittlichen Zahl von akz. Chrom. in den Spermakernen (EHRENDORFER 1960a, Tabelle 3) von der sporophytischen Durchschnittszahl:  $1,83 - 1,03 = 0,8$  akz.



Chrom.] Demnach muß die Beeinflussung vom sporophytischen Gewebe der Mutterpflanzen direkt auf die Pollenschläuche erfolgen.

Da unreduzierte Eizellen nur nach Befruchtung durch Pollenschläuche von 5x-Vätern zur Entwicklung kommen, werden die Chancen für Pollenschläuche von 2x-Vätern mit steigendem Prozentsatz von UR-Eizellen immer geringer. Um diese Fehlerquelle auszuschließen, wird im folgenden nur der Verhältnis-

Tabelle 5. Differenzen zwischen den Verhältniszahlen  $2R \times 2 : 2R \times 5$  bei verschiedenen  $f_2$ -Nachkommenschaften entsprechend Tabelle 4 als Ausdruck verschiedener Konkurrenzbedingungen für Pollenschläuche von 2x- und 5x-Vätern auf verschiedenen Klassen von  $F_1$ -Mutterpflanzen:  $s \times a$  (Serie 64) und  $a \times s$  (Serie 72)<sup>1</sup>. (Weitere Erklärungen im Text)

	akz. Chrom. (Pz)	$2R \times 2 : 2R \times 5$	$\chi^2$	P
$s \times a$ : 64	0+2	4:6	30,89	< 0,001
$a \times s$ : 72	0+2	129:6		
$a \times s$ : 72	0	20:0	1,92	< 0,2
	1	44:7	2,46	< 0,2
	2	109:6	0,56	< 0,5
	3	23:3	6,23	< 0,02
	4—6	3:5		

<sup>1</sup> Bei der Anwendung des  $\chi^2$ -Testes wird gefordert, daß die Klassen relativ groß und in sich homogen sind. Obwohl diese Voraussetzungen bei dem in der Tabelle 5 und 6 vorgelegten Zahlenmaterial nicht immer streng gegeben sind (besonders bei der Klasse  $a \times s$  ohne akz. Chrom.), dürfte es doch zweckmäßig sein, in diesem etwas kritischen Fall den  $\chi^2$ -Test anzuwenden.

Chrom. innerhalb  $a \times s$  zeigt, daß diese Unterschiede nicht willkürlich verteilt sind (Tabelle 5).

Das Ergebnis aus Tabelle 5 zeigt, daß zwischen den reziproken Kombinationen  $s \times a$ : Serie 64 und  $a \times s$ : Serie 72 (jeweils entsprechende Klassen mit 0 bzw. 2 akz. Chrom.) ein beträchtlicher, statistisch sehr signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Pollenschlauchkonkurrenz besteht:  $s \times a$  hat durchschnittlich wesentlich stärkere Hemmung von Pollenschläuchen der 2x-Väter (bzw. relative Förderung von Pollenschläuchen der 5x-Väter) als  $a \times s$ ; dieser Unterschied muß im wesentlichen plasmatisch bedingt sein.

Auch die akz. Chrom. wirken sich auf die Pollenschlauchkonkurrenz aus. Besonders klar wird dies beim Vergleich der Gruppen mit 3 und 4 bis mehr akz. Chrom. der  $a \times s$ -Serie 72, wo die Differenz auch statistisch gut gesichert ist. Bei den Gruppen mit 0, 1, 2 und 3 akz. Chrom. ist das Zahlenmaterial nicht

<sup>1</sup> Da Pollenschläuche von 5x-Vätern infolge einer Tendenz zur selektiven Befruchtung stärker auf UR-Eizellen abgezogen werden (vgl. S. 409), muß das tatsächliche Gesamtverhältnis im Griffelgewebe noch mehr zugunsten von 5x liegen.

wert  $2R \times 2 : 2R \times 5$  (anstelle von  $2R \times 2 : 2R \times 5 + 2UR \times 5$ ) verwendet werden. Dieser Wert stellt einen Ausdruck für die im Griffelgewebe verschiedener  $F_1$ -Pflanzen verschieden gesteuerte Wachstumskonkurrenz der Pollenschläuche von 2x- und 5x-Vätern dar<sup>1</sup>.

Verschiedene  $F_1$ -Mutterpflanzen beeinflussen die Pollenschlauchkonkurrenz sehr verschiedenartig; dies läßt sich an ihren  $f_2$ -Nachkommenschaften direkt ablesen: ausschließlich 2x-Väter (118, 129, 149), dominierende 2x-Väter (113, 114, 134, 122, 120, 137, 139, 143, 145). Gleichgewicht zwischen 2x- und 5x-Vätern (11, 12, 128), dominierende 5x-Väter (121), ausschließlich 5x-Väter (127) (Tabelle 4). Ein Vergleich von  $a \times s$ ,  $s \times a$  und den verschiedenen Zahlenklassen von akz.

groß genug, um eine statistische Absicherung der wohl ebenfalls vorhandenen Unterschiede in der Pollenschlauchkonkurrenz zu ermöglichen. Aus Tabelle 4, Spalte A, ergeben sich für die  $a \times s$ -Serie 72 folgende prozentuelle Anteile von  $2R \times 5$  aus  $2R \times 2 + 2R \times 5$ :

akz. Chrom.:	0	1	2	3	4—6
$2R \times 5$ :	0,0%	13,7%	5,2%	11,5%	62,5%

Im ganzen zeigt sich also, daß bei den Gruppen von  $F_1$  mit 0 bzw. mit der geraden Zahl von 2 akz. Chrom. die Hemmung der Pollenschläuche von  $2x$ -Vätern gering ist, während sie bei  $F_1$  mit 1 und 3, besonders aber bei einer größeren Anzahl von akz. Chrom. stark ansteigt und dabei die Werte der  $s \times a$ -Serien erreicht.

Ein Vergleich von  $f_2$ -Serien aus  $F_1$ -Mutterpflanzen mit gleicher plasmatischer Konstitution und gleicher Zahl von akz. Chrom., etwa 113—134 oder 139—129 (vgl. Tabelle 4), läßt auch eine genetische Komponente der Steuerung der Pollenschlauchkonkurrenz als sehr wahrscheinlich erscheinen.

#### 4. Reduzierte und unreduzierte Eizellen

Zwischen den verschiedenen  $f_2$ -Nachkommenschaften ergeben sich Unterschiede im prozentuellen Anteil von Individuen, die aus reduzierten (R) bzw. unreduzierten (UR) Eizellen der diploiden  $F_1$ -Mutterpflanzen entstanden sind (Tabelle 4, Spalten II—III, B). Auch diese Unterschiede sind auf idiotypische Differenzen zwischen den  $F_1$ -Pflanzen zurückzuführen (vgl. S. 406). Da unreduzierte Eizellen nur nach Befruchtung durch Pollenschläuche pentaploider Vaterpflanzen zur Entwicklung kommen ( $2UR \times 5$ , Ausfall von  $2UR \times 2!$ ), läßt sich der Anteil von UR-Eizellen nur aus  $2UR \times 5 : 2R \times 5$  (Verhältniszahl) bzw. aus  $2UR \times 5 : 2R \times 5 + 2UR \times 5$  (prozentueller Anteil) errechnen.

Die Beeinflussung der UR-Rate durch die  $F_1$ -Mutterpflanzen kann entweder mittelbar über die idiotypische Konstitution der Eizellen oder unmittelbar über das mütterliche Gewebe wirksam werden. Ein Vergleich der Ausgangszahlen akz. Chrom. in reduzierten (R) bzw. unreduzierten (UR) Eizellen ergibt für die  $a \times s$ -Serie 72 aus  $2R \times 5$  bzw.  $2UR \times 5$ ,  $M = 1,05$  bzw.  $0,98$  akz. Chrom. (vgl. Tabelle 3). Ein direkter Einfluß der idiotypischen Konstitution der Eizellen auf die relative Häufigkeit von R und UR ist demnach unwahrscheinlich. Auch die Vorzugsbefruchtung von UR-Eizellen durch Pollenschläuche pentaploider Väter (vgl. etwa die Serien 114, 137, 143, 120, 121) kann sich auf die Relation R:UR nur allgemein und für alle  $f_2$ -Serien gleichmäßig, nicht aber in spezifisch differenzierender Weise auswirken.

Die Ausbildung von UR-Eizellen muß demnach im wesentlichen unmittelbar durch die Mutterpflanzen gesteuert werden. Da sich in UR-Eizellen immer nur gerade Zahlen von akz. Chrom. vorfinden (auch bei Mutterpflanzen mit ungeraden Zahlen!) kommt als Cytomechanismus für die Entstehung dieser diploider Eizellen wohl nur eine *Restitutionskernbildung* in Frage (vgl. S. 417).

Eine Durchsicht der  $f_2$ -Nachkommenschaften im Hinblick auf die Anteile von  $2UR \times 5$  (Tabelle 4) zeigt, daß hier von 0% (etwa 139) bis 100% (13) alle Übergänge vorliegen. Gruppiert man zusammengehörige  $f_2$ -Serien zusammen, so zeigt sich, daß die UR-Rate offensichtlich von verschiedenen Komponenten

des Idiotypus abhängig ist. Für  $s \times a$ : Serie 64 ist der UR-Anteil 81,8%, für die reziproke  $a \times s$ : Serie 72 (entsprechende Klassen mit 0 bzw. 2 akz. Chrom.) nur 60,0%. Innerhalb der Serie  $a \times s$ : 72 ist mit steigender Zahl akz. Chrom. eine steigende Tendenz der UR-Rate festzustellen.

akz. Chrom.:	0	1	2	3	4—6
2UR $\times$ 5:	0,0%	50,0%	60,0%	70,0%	78,3%

Wegen der (wohl idiotypisch gesteuerten) starken Streuung innerhalb der Klassen und der geringen Individuenzahlen (keine Möglichkeit der Berücksichtigung der 2R  $\times$  2- und 2UR  $\times$  2-Werte!) ist eine Sicherung dieser Differenzen nicht möglich.

### 5. Zusammenhänge

Eine Durchsicht der Einzeldaten und Mittelwerte für die getrennt erfaßten prozentuellen Anteile von 5x-Vätern (mit R-Eizellen) und UR-Eizellen (mit 5x-Vätern) in den  $f_2$ -Serien (Tabelle 4) zeigt, daß hier eine positive Korrelation vorliegt. Eine Darstellung in

Tabelle 6. Differenzen zwischen den Verhältnis-zahlen  $2R \times 2 : 2R \times 5 + 2UR \times 5$  bei verschiedenen  $f_2$ -Nachkommenschaften entsprechend Tabelle 4 als Ausdruck verschiedener Pollenschlauchkonkurrenz und Eizellenproduktion auf verschiedenen Klassen von  $F_1$ -Mutterpflanzen:  $s \times a$  (Serie 64) und  $a \times s$  (Serie 72)<sup>1</sup>. (Weitere Erklärungen im Text)

	akz. Chrom. (Pz)	$2R \times 2 : 2R \times 5 + 2UR \times 5$	$\chi^2$	P
$s \times a$ : 64	0+2	4:33	900	<0,001
$a \times s$ : 72	0+2	129:15		
$a \times s$ : 72	0	20: 0	4,37	<0,05
	1	44:14		
	2	109:15		
	3	23:10		
	4—6	3:23	17,62	<0,001

<sup>1</sup> Vgl. dazu auch die Fußnote zu Tabelle 5.

hang rechtfertigt die Erstellung eines gemeinsamen Verhältniswertes aus  $2R \times 2$  gegen  $2R \times 5 + 2UR \times 5$  (Tabelle 4, Spalte C). Damit wird eine bessere statistische Sicherung der Differenzen möglich als bei den isolierten Werten (Tabelle 6).

Das Ergebnis zeigt, daß im Hinblick auf relative Förderung von Pollenschläuchen pentaploider Väter und Produktion unreduzierter Eizellen zwischen  $F_1$ -Pflanzen der beiden reziproken Kombinationen  $a \times s$ : Serie 64 und  $s \times a$ : Serie 72 hochsignifikante Unterschiede bestehen; die entsprechenden Faktoren kommen bei  $s \times a$  viel stärker zur Auswirkung als bei  $a \times s$ . Weiter zeigt die Tabelle, daß sich auch alle Gruppen von  $F_1$  mit verschiedener Zahl von akz. Chrom. in dieser Hinsicht  $\pm$  signifikant voneinander unterscheiden: Von der Klasse ohne akz. Chrom. (0,0%) zuerst bei 1 akz. Chrom. Zunahme (24,1%), dann bei 2 akz. Chrom. wieder Abnahme (12,1%) und schließlich bei 3 und 4 bis mehr akz. Chrom.

Kurvenform (Abb. 2) ergibt dementsprechend Parallelen zwischen den 5x- und UR-Kurven. Im Sinne der angenommenen Interpretation bedeutet diese Feststellung, daß die Hemmung der Pollenschläuche von 2x-Vätern (zugunsten solcher von 5x-Vätern) und die Hemmung der Ausbildung reduzierter Eizellen (zugunsten unreduzierter Eizellen) bis zu einem gewissen Grad von einem gemeinsamen Steuerungssystem abhängig sind. (Unterschiede zwischen zusammengehörigen  $f_2$ -Serien (etwa 137—139) zeigen allerdings, daß dabei keine vollständige Koppelung vorliegt.) Dieser Zusammen-



Maximalwerte (30,3% und 88,5%). Entsprechende Prozentzahlen ( $2R \times 5 + 2UR \times 5$  gegen  $f_2$  total) finden sich in Tabelle 4, Spalte C, und graphisch dargestellt in Abb. 2.

In das Diagramm (Abb. 2) wurden weiters auch die Mittelwerte des Fertilitätsindex (Keimlinge pro Köpfchen, vgl. Tabelle 1) für die reziproken Kombinationen und die  $F_1$ -Gruppen mit verschiedenen akz. Chrom.-Zahlen eingetragen. Die Parallelität im Kurvenlauf und damit die gute Korrelation besonders zwischen (reduzierter) Fertilität und  $5x + UR$ -Prozenten ist klar erkennbar. Damit ergibt sich als notwendige Schlußfolgerung, daß *Pollenschlauchhemmung von 2x-Vätern und gestörte Entwicklung von R-Eizellen entscheidende Komponenten der mangelhaften Fertilität* der  $F_1$ -Hybriden zwischen *A. setacea* und *A. asplenifolia* sind. Daß es sich dabei nicht um die alleinigen Ursachen handelt, geht etwa aus dem Vergleich der im Hinblick auf Fertilität ähnlichen, im Hinblick auf  $5x$ - und UR-Raten aber deutlich verschiedenen  $f_2$ -Serien mit 1 bzw. 4 bis mehr akz. Chrom. hervor (Tabelle 4). Diesen Ergebnissen sind hinzuzufügen die offensichtlich durch Pollenschlauchhemmung bedingte mangelhafte Kompatibilität bei der Kombination *a* (ohne akz. Chrom.)  $\times$  *s* und die mangelhafte Kreuzbarkeit von  $s \times a$ - und  $a \times s$ - $F_1$  ohne akz. Chrom. (S. 401). Damit wird klar, daß die komplexe Kreuzungs- und Sterilitätsbarriere zwischen den beiden diploiden *Achillea*-Arten primär in Form mangelhafter Entwicklungsmöglichkeiten bestimmter männlicher und weiblicher Haplonten auf bestimmten P- und  $F_1$ -Diplonten in Erscheinung tritt. Erst sekundär, im wesentlichen erst in der  $F_2$ , machen sich auch innerhalb der Diplonten Störungserscheinungen in der Weise bemerkbar, daß in den Nachkommenschaften subvitale bis (sub)letale Individuen auftreten (EHRENDORFER 1959e).

Die Bedeutung der akz. Chrom. in diesem komplexen Barriersystem, an dem plasmatische ebenso wie genische (bzw. kryptostrukturelle) Faktoren beteiligt sind, ist offensichtlich vor allem im Wirkungsbereich Diplophase  $\rightarrow$  Haplophase gegeben. Gegenüber den hier festgestellten, z. T. sehr beträchtlichen Auswirkungen treten auf die Diplophase beschränkte Effekte ( $F_1$ : Vitalität und Morphologie) stark an Bedeutung zurück. Dabei stellen die akz. Chrom. immer nur *eine* Komponente eines komplexen Genom-Plasmon-Wirksystems dar. Dieses System ist durch Heterozygotie und plasmatische Unterschiede schon von den Elternsippen her differenziert und bestimmt dementsprechend die teils stärkeren,

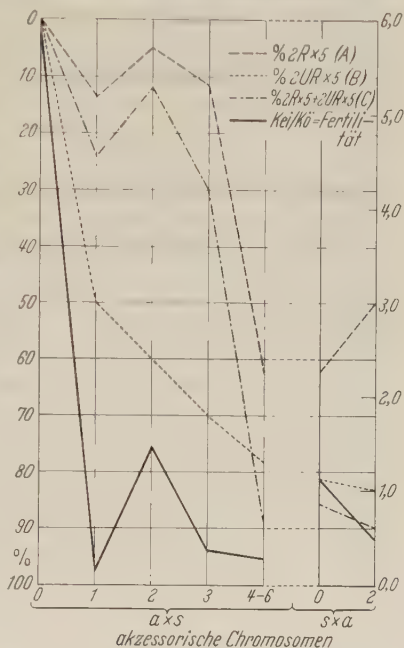


Abb. 2. Kurven für A: Pollenschlauchkonkurrenz (2x- und 5x-Väter), B: Eizellenproduktion (reduzierte und unreduzierte Eizellen), C: Sammelindex für A + B, und Fertilität (Keimlinge pro Köpfchen) bei  $F_1$  ( $a \times s$  und  $s \times a$ ) mit verschiedenen Zahlen von akz. Chrom. entsprechend Tabelle 1 und 4. (Weitere Erklärungen im Text)

Tabelle 7. Zusammenhänge zwischen Primärzahl ( $P_z$ ) sowie zahlenmäßiger Stabilität der akz. Chrom. (— = stabil; — = schwach; ! = mäßig; !! = stark instabil; vgl. EHRENDORFER 1960a, Tabelle 2) und dem Auftreten spontaner Chromosomenaberrationen (I = schwach, II = mäßig; vgl. EHRENDORFER 1959a) bei  $F_1$ - und  $F_2$ -Hybriden von *A. asplenifolia* und *A. setacea*

Serien- Individuen- Nummern	F <sub>1</sub>																	F <sub>2</sub>				
	72—													96—								
	64—	13	113	114	131	122	129	143	147	149	150	144	145	119	121	127	128	4	8	16	13	11
Akz. Chrom. (Pz) . . . .	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	4	6 (?)	4 (?)	4	2	2	2	3	4
Stab./Instab. Wurzel, Sproß ♂ + ♀ Archespor . . . .	—	—	±	—	—	±	!	—	—	—	—	±	± (?)	!!	!!	!!	!!	—	—	—	—	!
Spont. Chrom.-Aberr. . . .	I	II	—	—	I	—	I	—	—	—	—	—	—	—	II	I	I	—	—	—	—	I

teils schwächeren Auswirkungen der akz. Chrom. Bemerkenswert ist dabei, daß mit steigender Zahl von (identischen) akz. Chrom. keine gleichmäßig ansteigende Wirkung gegeben ist, sondern daß die balancierte Zahl von 2 akz. Chrom. gegenüber den Zahlen 1, 3 und 4—6 fast immer eine bevorzugte Sonderstellung einnimmt.

#### F. Auswirkungen akzessorischer Chromosomen auf die spontane Chromosomenaberrationsrate

22 experimentell hergestellte  $F_1$ - und  $F_2$ -Hybriden von *A. asplenifolia* und *A. setacea* wurden in der Pollenmeiose auf das Vorkommen von spontanen Chromosomenaberrationen untersucht (vgl. Tabelle 7 und EHRENDORFER 1959a, S. 380—381). Während die Parentalpflanzen PW-I (a) und 13-1 (s) sich als ungestört erwiesen, konnten bei 8 der 22 Hybriden schwache bis mäßige spontane Aberrationen (vereinzelte freie Fragmente, terminale Chromatidblockaden, Anaphasebrücken mit und ohne Fragmente) festgestellt werden. Es ist nun bemerkenswert, daß sich unter den gestörten  $F_1$  und  $F_2$  beide Individuen ohne akz. Chrom. der Kombination  $s \times a$  und 6 von 9 der Individuen mit intra-individuell mäßig bis stark instabiler Zahl von akz. Chrom. aus der Kombination  $a \times s$  finden. Dagegen weist keines der Individuen mit stabiler oder nur schwach instabiler Zahl von 2 (bzw. 3) akz. Chrom. spontane Chromosomenaberrationen auf (jeweils mindestens 50 PMZ analysiert).

Das Verhältnis von chromosomenreproduktiv ungestörten zu gestörten  $F_1$ - und  $F_2$ -Hybriden der Serien 64, 72 und 96 ist demnach für 11 Individuen ohne akz. Chrom. bzw. mit mäßig bis stark instabiler Zahl von akz. Chrom. sowie 3:8, bei 11 weiteren mit stabiler (oder nur schwach instabiler) Zahl von akz. Chrom. aber so wie 11:0. Die Wahrscheinlichkeit, daß es sich hier um eine Zufallsverteilung handelt, ist nach  $\chi^2$  nur  $P < 0,001$ .

Weiters sei auf entsprechende Befunde bei den Wildformen hingewiesen. Obwohl hier spontane Chromosomenaberrationen bei Diploiden relativ häufig sind (11 von 35 = 31,4%) konnten bei 7 Diploiden mit akz. Chrom. (16,3%) keine derartigen Störungen festgestellt werden.

Bei *Achillea* wurde ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von spontanen Chromosomenaberrationen und intra-individueller Zahlen-Instabilität der Normalchromosomen belegt (EHRENDORFER 1959a). Das vorliegende Material läßt ähnliche Verhältnisse für die akz. Chrom. vermuten. Aberrationen und Zahlen-Instabilität wären demnach nur Folgen einer gemeinsamen Ursache, und zwar offenbar einer  $\pm$  gestörten Chromosomenreproduktion. Dementsprechend kann vielleicht die Arbeitshypothese vertreten werden, daß mit dem Hinzutreten einer optimalen Zahl von akz. Chrom. zu einem derartig gestörten Genom eine Pufferwirkung gegen Chromosomenaberrationen und damit auch intra-individuelle Zahlenstabilität gegeben ist (vgl. dazu auch EHRENDORFER 1959a und 1960a).

#### G. Balance der Zahl akzessorischer Chromosomen über drei Generationen

Der Aufbau einer experimentellen Population aus reziproken Kreuzungen der beiden diploiden Ausgangsindividuen *A. asplenifolia* WP-I und *A. setacea* 13-1 wurde bereits in den vorigen Abschnitten dargestellt. Dabei wurden verschiedene Zahlen von akz. Chrom. durch die prämeiotisch instabile WP-I in die  $F_1$ -Serien  $a \times s$ : 72 und  $s \times a$ : 64 (25 Individuen, vgl. EHRENDORFER 1960a, Tabelle 2) eingeführt. Nach Isolation und freiem Abblühen dieser  $F_1$  entstanden 203 diploide

Tabelle 8. Akzessorische Chromosomen in 3 Generationen einer experimentellen Population (230 diploide Individuen): 2 P-Individuen (*A. setacea* 13-1 und *A. asplenifolia* WP-I), 25  $F_1$  (reziproke  $F_1$ -Serien 64 und 72) und 203  $F_2$ . Primärzahlen akz. Chrom., Mittelwerte und Differenzen sowie prozentuelle Anteile für die einzelnen Generationen. (Weitere Erklärungen im Text)

		n	akz. Chrom. (Pz)							M	D	
			0	1	2	3	4	5	6			
P		2	1 50,0%	1 50,0%						0,50		—
F <sub>1</sub>		25	3 12,0%	4 16,0%	10 40,0%	4 16,0%	3	—	1 16,0%	2,16	D <sub>P—F<sub>1</sub></sub>	+1,66
F <sub>2</sub>	akz. Chrom. (Pz) der Mutterpflanzen 4—6 3 2 1 0	23	7	13	2	—	1	—	—	0,91	D <sub>F<sub>1</sub>—F<sub>2</sub></sub>	—0,17
		44	—	12	15	8	6	2	1	2,41		+0,83
		110	4	33	52	18	2	1	—	1,85		—0,23
		23	—	14	4	3	2	—	—	1,69		—0,98
		3	1	2	—	—	—	—	—	0,67		—2,91
		203	12 5,9%	74 36,4%	73 36,0%	29 14,3%	11	3	1 7,4%	1,83		—0,33

$f_2 = F_2$ -Individuen (vgl. Tabelle 3). Durch freie Kreuzungsmöglichkeiten dieser  $F_1$ -Individuen untereinander, durch Keimungsteste an  $\pm$  äquivalenten Mengen fruchtender Köpfchen der  $F_1$  und durch die zufallsgemäße Auswahl entsprechender  $F_2$ -Pflanzen ist die Gewähr dafür gegeben, daß mit den vorliegenden 230 diploiden Individuen über die 3 Generationen P,  $F_1$  und  $F_2$  tatsächlich ein repräsentativer Querschnitt durch die experimentelle Hybrid-Population gegeben ist.



In Tabelle 8 sind die Individuen der  $P-F_1-F_2$ -Generationsfolge im Hinblick auf die Primärzahl ihrer akz. Chrom. zusammengefaßt; die  $F_2$  wurde nach der Primärzahl der  $F_1$ -Mutterpflanzen noch weiter aufgeschlüsselt. Einige Individuen mit stark labiler akz. Chrom.-Zahl und damit etwas unsicherer Primärzahl (vgl. EHRENDORFER 1960a) wurden nicht gesondert gekennzeichnet. Für jede Generation ist der prozentuelle Anteil von Individuen mit bestimmten Primärzahlen angegeben. Ferner wurden noch die entsprechenden Mittelwerte für die Primärzahlen der akz. Chrom. errechnet.

Eine normale Weitergabe der akz. Chrom. vorausgesetzt, müßten die Mittelwerte innerhalb der  $P-F_1-F_2$ -Reihe einigermaßen gleichbleiben bzw. für die Teilpopulationen der  $F_2$  bestimmte Erwartungswerte auftreten. Wie Tabelle 8 zeigt, treffen diese Voraussetzungen nicht zu. Das Ausmaß der Abweichungen kann einerseits durch die Differenzen ( $D$ ) zwischen den Mittelwerten der Zahl akz. Chrom.  $P-F_1$  und  $F_1-F_2$  ausgedrückt werden; andererseits lassen sich für die Teilpopulationen der  $F_2$  in entsprechender Weise Differenzen aus den zu erwartenden mittleren Zahlen akz. Chrom. (halbe Zahl der Mutterpflanzen plus halbe Zahl der Total- $F_1$ , d. h.  $2,16:2 - 1,08$ ) und den tatsächlich festgestellten Zahlen ermitteln. Alle diese Differenzen sind durch Faktoren bedingt, welche die Zahl der akz. Chrom. im Sporophyt oder Gametophyt entweder direkt oder indirekt beeinflussen und damit auch ihre normale Vererbung modifizieren.

Wie schon im Beitrag EHRENDORFER 1960a gezeigt wurde, ist eine direkte Beeinflussung der Zahl der akz. Chrom. bei den  $a \times s$ - und  $s \times a$ -Hybriden auf verschiedenartige Weise möglich. Darüber gibt Tabelle 9 in zusammenfassender Weise Aufschluß.

Tabelle 9. Die Phasen direkter Regulation der Zahl akz. Chrom. bei Individuen einer experimentellen  $a \times s$ -Population

	Individual-entwicklung	Regulationsmechanismus	Träger und Vorkommen
Sporophyt	Wurzel- und Sproßregion	überwiegend somatische Reduktion	bei Individuen mit steigender Zahl akz. Chrom. in steigender Intensität
	♂ und ♀ Archiespor	prämeiotische Akkumulation	fast ausschließlich bei Individuen mit 1 akz. Chrom., bei diesen aber regelmäßig
	♂ und ♀ Meiose	Elimination von univalenten akz. Chrom.	in geringem Ausmaß und fast ausschließlich bei Individuen mit ungerader Zahl akz. Chrom.
	Pollen und Embryosack	postmeiotische Akkumulation	nur höchst selten (und z. T. unsicher)

Die Wirkung der Cyto-Mechanismen, welche die Zahl der akz. Chrom. besonders in Wurzel, Sproß und Archiespor *direkt* beeinflussen, tritt an den  $M$ - und  $D$ -Werten (Tabelle 8)  $\pm$  unmittelbar in Erscheinung. Die Akkumulation im Archiespor bei den  $F_1$ -Pflanzen mit 1 akt. Chrom. und bei WP-I (*A. asplenifolia*) kommt in den  $D$ -Werten  $+0,83$  und  $+1,66$  zum Ausdruck. Aus dem Ansteigen der Minuswerte von  $-0,23$  über  $-0,89$  bis  $-2,91$  ist die Zunahme der Intensität der somatischen Elimination akz. Chrom. mit steigender Zahl akz. Chrom. erkennbar. Damit ist eine weitere Bestätigung der cytologischen Befunde bezüglich

der Zahlenregulation in Wurzel, Sproß und Archespor (EHRENDORFER 1960a, Tabelle 1 und 2) auf genetischer Basis möglich.

Wie ein Vergleich der  $D$ -Werte für die Gesamt- $F_2$  und die entsprechenden Teilpopulationen (etwa die mit 4—6 akz. Chrom.) dartut, ist die tatsächliche Auswirkung eines bestimmten Regulationsmechanismus auf den zahlenmäßigen „Haushalt“ einer Population an akz. Chrom. davon abhängig, wie viele Individuen als Träger dieses Mechanismus funktionieren und besonders, wie groß die Nachkommenschaften sind, die diese Träger produzieren. Die indirekte Beeinflussung der Zahl akz. Chrom. in einer Population durch Faktoren, welche die Zahl entsprechender Träger-Individuen beeinflussen, verdient daher besondere Beachtung. Als wichtig in dieser Hinsicht wurden Kompatibilität, Vitalität und vor allem Fertilität mit den Komponenten Pollenschlauchwachstum und Produktion von Eizellen bereits in den vorigen Abschnitten behandelt. Die Wirksamkeit der indirekten Faktoren wird an mehreren Punkten in Tabelle 8 erkennbar: Die relativ geringe Auswirkung der Akkumulationsphase der Gruppe mit 1 akz. Chrom. ist zum Großteil durch ihre geringe Fertilität verursacht; die kaum merkliche Auswirkung der Gruppe mit 4—6 akz. Chrom. steht im Zusammenhang mit

Tabelle 10. Selbststeuerung der Zahlenbalance akz. Chrom. durch Beeinflussung direkter (a—b) und indirekter (c—f) Regulationsmechanismen in einer experimentellen  $a \times s$ -Population

Individuen mit Primärzahlen von	Regulationsmechanismen	Funktion in der Population
0 akz. Chrom.	a) Somatisch b) prämeiotisch c) mäßige bis gute Fertilität d) variable Hemmung von $2x/2$ -Pollenschläuchen, mit anderen 0-Individuen (immer?) $\pm$ inkompatibel e) variable Produktion von UR-Eizellen	Nicht-träger
1 akz. Chrom.	a) Somatisch $\pm$ stabil bis schwach instabil b) meist ♂ und besonders ♀ prämeiotische Akkumulation von akz. Chrom. c) schlechte Fertilität d) mäßige Hemmung von $2x/2$ -Pollenschläuchen e) mäßige Produktion von UR-Eizellen	Vermehrungsgruppe Stabilitätsgruppe Träger
2 akz. Chrom.	a) Somatisch weitgehend stabil, selten $\pm$ instabil b) keine prämeiotische Akkumulation von akz. Chrom. c) gute bis mäßige Fertilität d) fehlende oder schwache Hemmung von $2x/2$ -Pollenschläuchen e) fehlende oder schwache Produktion von UR-Eizellen	
3 akz. Chrom.	a) Verstärkte somatische Reduktion akz. Chrom. b) keine prämeiotische Akkumulation von akz. Chrom. c) mäßige Fertilität d) mäßige $2x/2$ -Pollenschlauchhemmung e) mäßige Produktion von UR-Eizellen	
4—6 akz. Chrom.	a) Starke somatische Reduktion akz. Chrom. b) kaum prämeiotische Akkumulation akz. Chrom. c) schlechte Fertilität d) starke bis absolute $2x/2$ -Pollenschlauchhemmung e) starke bis absolute Produktion von UR-Eizellen f) $\pm$ gesenkte Vitalität	Verminderungsgruppe

der hier überaus geringen Produktion von diploiden  $F_2$ ; der starke Abfall an  $F_2$  ohne akz. Chrom. ist auf die  $\perp$  reduzierte Kompatibilität zwischen den 0-Individuen der Serien 64 und 72 zurückzuführen (S. 401).

Wodurch werden nun direkte und indirekte Regulationsmechanismen der Zahl akz. Chrom. gesteuert! Zu einem Gutteil *rückwirkend* durch die Zahl der akz. Chrom. in den einzelnen Individuen selbst. Das sei in der folgenden Tabelle 10 für die  $P-F_1-F_2$ -Serie von  $a \times s$  und  $s \times a$  unter Mitberücksichtigung der schon

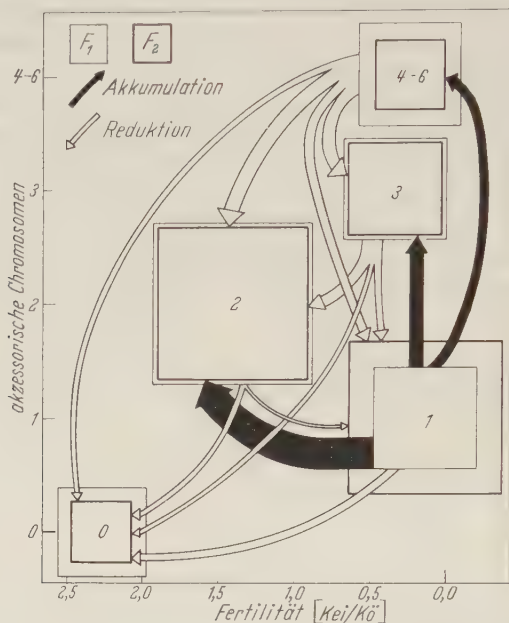


Abb. 3. Balance-System von Individuen mit verschiedenen Primärzahlen von akz. Chrom. in 2 Generationen einer experimentellen Hybridpopulation ( $F_1$  und  $F_2$ ) von *Achillea asplenifolia* und *A. setacea*. Die Größe der Quadrate entspricht der relativen Individuenzahl, die Stärke und Richtung der Pfeile entspricht der Intensität und Richtung der direkt wirksamen Regulationsmechanismen: somatische Reduktion und prämeiotische Akkumulation. (Weitere Erklärungen im Text)

bei EHRENDORFER 1960a veröffentlichten Angaben nochmals zusammenfassend dargestellt.

Damit wird klar, daß die einzelnen Gruppen von Nichtträgern bzw. Trägern von akz. Chrom. in der Population ganz bestimmte Funktionen haben. Diese Funktionen beziehen sich einerseits auf die Zahlenbalance der akz. Chrom. selber: Vermehrung — Stabilisierung — Verminderung, andererseits aber (und viel wichtiger) auf so grundlegende Aspekte des genetischen Systems wie Kompatibilität, Pollenschlauchwachstum, Eizellenproduktion, Fertilität und Vitalität. In der halbschematischen Abb. 3 wurde versucht, dieses komplexe Balancesystem in der vorliegenden experimentellen Population mit ihrer Abfolge  $F_1 \rightarrow F_2$  teilweise graphisch zur Darstellung zu bringen. In einem Koordinatensystem mit Fertilität (Tabelle 1) und Primärzahl der akz. Chrom. wurden, entsprechend den tatsächlichen prozentuellen Anteilen (Tabelle 8), die  $F_1$ - und  $F_2$ -Gruppen eingetragen. Durch Pfeile von  $F_1$  zu  $F_2$  wurden die das Zahlensystem *direkt* beeinflussenden



Cyto-Mechanismen der somatischen Reduktion und der prämeiotischen Akkumulation verdeutlicht; die Strichdicke entspricht dabei der durchschnittlichen Intensität dieser Cyto-Mechanismen bei den einzelnen Zahlengruppen (EHRENDORFER 1960a, Tabelle 1 und 2); Aufgliederung und Richtung der Pfeile ergeben sich annäherungsweise aus den Abweichungen der einzelnen  $F_2$ -Nachkommenschaften von den Erwartungswerten.

## H. Diskussion

### 1. Verschiedenartige Auswirkungen akzessorischer Chromosomen

Über mögliche funktionelle Bedeutungen akz. Chrom. bestehen noch weitgehende Unklarheiten. Im Bereich des diploiden Sporophyten sind die phänotypischen Auswirkungen der akz. Chrom. ganz allgemein schwach (MÜNTZING 1958, 1959), im Wirkungsbereich Sporophyt  $\rightarrow$  Gametophyt scheinen dagegen ihre Auswirkungen viel bedeutungsvoller. Die von einer sehr komplexen Faktorenkonstellation abhängige Fertilität wird bei den vorliegenden *Achillea*-Hybriden von akz. Chrom. teilweise recht entscheidend mitbeeinflusst; dabei besteht die Möglichkeit einer positiven Auswirkung bei der optimalen Zahl von 2 akz. Chrom. (S. 403). Sichergestellt ist hier ebenso wie bei allen anderen daraufhin untersuchten Sippen, daß eine hohe (im einzelnen sehr verschieden hohe) Zahl von akz. Chrom. fertilitätssenkend wirkt. Als Einzelkomponenten dieser direkten und negativen Fertilitätsbeeinflussung treten besonders die mit steigender Zahl von akz. Chrom. steigend gestörten ♂, ♀ Meiosen, Pollen- und ES-Mitosen in Erscheinung. Auf der ♂ Seite ist etwa Größenzunahme (*Zea*: RANDOLPH 1941) sowie verzögerte und  $\pm$  gestörte Entwicklung des Pollens (*Secale*: MÜNTZING 1946a, *Anthoxanthum*: ÖSTERGREN 1947, *Trillium*: SPARROW, POND und SPARROW 1952, *Plantago coronopus* — totale Pollensterilität bereits bei 1 akz. Chrom.: PALIWAL and HYDE 1959) zu nennen. Auf der ♀ Seite ist bei *Achillea* vor allem die Zunahme des Anteils von unreduzierten Eizellen hervorzuheben (S. 410). Wahrscheinlich bestehen hier Parallelen zu der mit steigender Zahl akz. Chrom. steigenden Tendenz zur Bildung von Restitutionskernen, wie sie für *Secale* (♀ und ♂ Meiose: HÅKANSSON 1948a, 1957), *Trillium* (3x-Individuen: SPARROW et al. 1952), *Festuca* (♂ prämeiotische Mitosen und Meiose: BOSEMARK 1957a) und *Anthurium* [fakultative Apomixis(?): PFITZER 1957] beschrieben wurden.

Die Beeinflussung des Pollenschlauchwachstums durch akz. Chrom. geht bei *Achillea* vom diploiden Gewebe der Mutterpflanze aus; die genetischen Daten erlauben Rückschlüsse auf teilweise Aufhebung bestimmter Inkompatibilitätsbarrieren (S. 401), verschieden starke Hemmung von haploiden Pollenschläuchen und damit entscheidende Beeinflussung der Pollenschlauchkonkurrenz bei Mischbestäubungen (S. 409). Entsprechende Ergebnisse an anderen Sippen mit akz. Chrom. liegen bisher noch nicht vor. Immerhin wird eine derartige Auswirkung verständlich, wenn man die starke Beeinflussung des Pollenschlauchwachstums selbst durch geringfügige chromosomenstrukturelle Differenzierung (vgl. etwa BUCHHOLZ und AVERY 1935, BUCHHOLZ und BLAKESLEE 1936b, MÜNTZING 1939a, HARTE 1958) bzw. durch Anwesenheit von Fragmentchromosomen (*Zea*: RHODES 1940, *Triticum* — 2x: L. SMITH 1947a, *Petunia*: BREWBAKER und

NATARAJAN 1960) berücksichtigt. — Auch auf die Verschiedenheit der Befruchtungskapazität bei Pollenschläuchen mit verschiedenem Inhalt von akz. Chrom. bei *Zea* muß in diesem Zusammenhang hingewiesen werden (ROMAN 1948, BLACKWOOD 1956, CATCHESIDE 1956). — Alle diese Daten lassen vermuten, daß akz. Chrom. ganz allgemein eine wichtige Komponente der idiotypischen Steuerung im Wirkungsbereich: Sporophyt der Mutterpflanze → Entwicklung der ♂ und ♀ Gametophyten → Fertilität darstellen.

Eine besonders interessante Frage ist, ob die akz. Chrom. mit Formwechsel und Reproduktion der Kernbestandteile im Zusammenhang stehen, wobei unter anderem auch an eine Beeinflussung des Eu/Heterochromatin-Gleichgewichtes gedacht werden könnte (DARLINGTON und THOMAS 1941, DARLINGTON und UPCOTT 1941a, DARLINGTON 1956, EHRENDORFER 1959a). Hinweise für die Richtigkeit dieser Hypothese ergeben sich bei *Achillea* einerseits aus einem gewissen Zusammenhang der akz. Chrom. mit der Erscheinung der spontanen Chromosomen-Aberrationen (S. 412 und EHRENDORFER 1959a). Als weitere Stütze für die Annahme solcher Zusammenhänge können Daten über Aberrationspufferung durch überzählige heterochromatische Elemente (LA COUR 1953b, McLEISH 1955), aber auch Angaben über aberrationsfördernde Wirkung von akz. Chrom. bei *Trillium* (RUTISHAUSER 1956b) gelten; weiters wird auch die Beteiligung akz. Chrom. an der Auslösung von überzähligen Pollenmitosen ihrem Einfluß auf die Reproduktion der Kernbestandteile zugeschrieben (DARLINGTON und THOMAS 1941, LIMA-DE FARIA 1947). Bei *Achillea* ist ferner die direkte intra-individuelle Selbststeuerung der akz. Chrom.-Zahl am ehesten als Ergebnis einer Beeinflussung ihrer Reproduktion über das Eu/Heterochromatin-Gleichgewicht zu deuten (vgl. EHRENDORFER 1959e, 1960a). Weiters ergeben sich Zusammenhänge zwischen dem Vorhandensein von akz. Chrom. und der allgemeinen Chromosomenreproduktion aus ihrem Einfluß auf „stickiness“ und meiotische Non-Disjunction bei *Secale* (HÅKANSSON 1948a) und *Festuca* (BOSEMARK 1954a, 1956b). Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang ferner Beziehungen zwischen akz. Chrom., heterochromatischen „knobs“ (LONGLEY 1938, MORGAN 1943) und Nukleolenbildung (LIN 1955) bei *Zea*.

Die bisherigen Befunde über Auswirkungen von akz. Chrom. bedürfen noch vielfältiger Ergänzungen. Dabei wäre mehr als bisher auf den wohl entscheidenden Einfluß dieser Spezialchromosomen auf Gametophyt und Fortpflanzungssystem zu achten.

## 2. Die Rolle akzessorischer Chromosomen im phylogenetischen Differenzierungsprozeß

Eine Übersicht über das Vorkommen von akz. Chrom. bei höheren Pflanzen (DARLINGTON und WYLIE 1955, DARLINGTON 1956) zeigt, daß sie bei krautigen (besonders hemikryptophytischen), allogamen, chromosomenstrukturell differenzierten und diploiden Sippen am häufigsten sind. Als Beispiele aus Diploid-Polyploid-Komplexen sei etwa auf *Ficaria verna* s. l., *Tradescantia*, *Festuca pratensis-arundinacea*, *Holcus lanatus-mollis* und *Agrostis canina-tenuis-gigantea* hingewiesen. In dieser Reihe stellen die hemikryptophytischen allogamen Sippen von *Achillea* mit Konzentration von akz. Chrom. auf der in chromosomen-

struktureller Hinsicht (spontane Aberrationen!) überaus labilen Diploidstufe (EHRENDORFER 1959a, c) einen besonders klaren weiteren Beleg dar.

Diese Verteilung der akz. Chrom. ist offensichtlich durch verschiedene Faktoren bedingt. Erstens sind die Möglichkeiten für die Entstehung von akz. Chrom. in aberrationslabilen, chromosomenstrukturell polymorphen, vor allem auch in hybridogenen (S. 412) und unter nicht zu starkem Selektionsdruck stehenden, phylogenetisch „experimentierenden“ Populationen<sup>1</sup> am günstigsten; diese Voraussetzungen sind vor allem bei Hemikryptophyten gegeben. Zweitens können die Auswirkungen von akz. Chrom. schon aus quantitativen Gründen eher auf der diploiden als auf höheren Polyploidstufen zur Geltung kommen. Drittens scheint das charakteristische System des balancierten Zahlenpolymorphismus der akz. Chrom. nur bei Allogamen<sup>1</sup> möglich.

Als Träger von funktionell wenig spezialisiertem Heterochromatin (und wenig spezialisiertem [!] Euchromatin) und infolge der Plastizität ihrer quantitativen Dosierung (Akkumulation — Stabilisierung — Reduktion) werden die akz. Chrom. zu Elementen des Idiotypus, die im Vergleich zu den Normalchromosomen durchaus eigenen Gesetzmäßigkeiten folgen. Ihre phylogenetische Bedeutung liegt offensichtlich vor allem darin, daß sie gegenüber dem relativ starren Block der im Standard-Genom festgelegten Potenzen sehr versatile Träger von Ausgleichs- und Zusatzfaktoren darstellen und damit für die Population neue Möglichkeiten der Variation erschließen: Die bisherigen Daten bei *Achillea* lassen einen Einfluß der akz. Chrom. auf die Chromosomenreproduktion und damit weiter auf die spontane Aberrationsrate vermuten. Wie die vorliegenden Kreuzungsergebnisse dartun, können infolge Auswirkungen der akz. Chrom. auf Kompatibilitätsbarrieren und Pollenschlauchkonkurrenz Isolation und Hybridisierung von Sippen entscheidende Veränderungen erfahren. Die Beeinflussung der Produktionsrate unreduzierter Eizellen kann bei der Überbrückung von Polyploid-Barrieren, bei der Entstehung neuer Polyploider und als Vorstufe zu apomiktischer Fortpflanzung phylogenetische Bedeutung erlangen. Als Mittler von Translokationen können akz. Chrom. die Herausbildung neuer Chromosomenzahlen ermöglichen (H. LEWIS 1951, FERNANDES 1952), als Träger entscheidender Chromosomenabschnitte können sie die Hybridisierung von sonst nicht oder kaum kombinierbaren strukturell verschiedenen Sippen ermöglichen (analog zu den Trisomen-Kreuzungen bei *Datura*: COLE 1956). — Alle diese teils schon belegten, teils erst vermuteten phylogenetischen Funktionen von akz. Chrom. haben mehr Bedeutung auf der Organisationsstufe von Populationen bzw. Populationsgruppen als auf der von Einzelindividuen. Dieser Gesichtspunkt ist bei vielen bisherigen Versuchen, die funktionelle Bedeutung der akz. Chrom. zu erklären, zu wenig berücksichtigt worden.

Grundsätzlich können akz. Chrom. im Laufe der Phylogenie zu Trägern sehr verschiedenartiger Funktionen werden. Dabei stellt sich mit steigender funktioneller Bedeutung eine gewisse Bevorzugung von geraden Zahlen (angedeutet bei *Achillea*: Fertilität und Zahlenstabilität, Tabelle 1, und EHRENDORFER 1960a,

<sup>1</sup> Ein gutes Beispiel ist die Zahlen-Balance der akz. Chrom. bei *Lilium medeoloides*: an günstigen Standorten stark differenzierte und sexuelle, an ungünstigen Standorten vereinheitlichte und vegetativ sich fortpflanzende Populationen (SAMEJIMA 1958).



Tabelle 1), schließlich weitgehende bis absolute Fixierung ein (etwa bei diversen diploiden Populationen der *Poa alpina*-Gruppe: MÜNTZING 1946b, 1948a, HÅKANSSON 1948b, 1954b, MÜNTZING und NYGREN 1955, NYGREN 1955); damit ist eine Annäherung der akz. Chrom. an Normalchromosomen gegeben.

Von ÖSTERGREN wurde 1945a die These vertreten, daß akz. Chrom. bloß „parasitäre“ Bestandteile des Erbgefüges wären. Demgegenüber läßt die rasch anwachsende Literatur immer klarer erkennen, wie weitverbreitet und wie verschiedenartig in ihren Auswirkungen diese Spezialchromosomen sind. Das Auftreten akz. Chrom. muß demnach zwar als ein abgeleiteter, aber doch als ein recht bedeutsamer Differenzierungsmechanismus in der Mikro-Evolution besonders bei allogamen Diploiden gewertet werden.

Für die großzügige Gewährung von Arbeitsmöglichkeiten am Botanischen Institut der Universität Wien gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. L. GEITLER. Mein Bruder, Herr Dozent Dr. K. EHRENDORFER hat mich dankenswerterweise in statistischen Fragen beraten.

### Summary

1. Two diploid ( $2x, n = 9$ ) species of the *Achillea millefolium*-complex (*Compositae-Anthemideae*), *A. asplenifolia* (= *a*, with and without accessory chromosomes = acc.) and *A. setacea* (= *s*, without acc.) were crossed reciprocally to give  $F_1$  and  $F_2$ .

2. Incompatibility barriers between *a* without acc. as mother and *s* as father, and between most of the  $F_1$  without acc. can be overcome by using individuals with acc. chrom. for the crossings.

3. Using an *a*-plant with labile numbers of acc. in ♂ and ♀ gametes it was possible to produce genetically  $\pm$  identical  $F_1$  with numbers of acc. varying between 0 and 6.

4. In the sporophyte no morphological effects of acc. have been observed. Vitality possibly is reduced in individuals with high numbers of acc.

5. Fertility of  $a \times s$ - $F_1$  is negatively influenced by 1 and 3 to more acc., but 2 acc. have a relatively positive effect (Table 1, 2, Fig. 2).

6. In an isolation test  $a \times s$ - and  $s \times a$ - $F_1$  with varying numbers of acc. were open pollinated with each other and with 5x hybrids (*A. millefolium*  $\times$  *A. collina*). The resulting  $f_2$ -plants are products of fertilization of reduced (= R) or unreduced (= UR) egg cells by pollen tubes of 2x or 5x fathers:  $2R \times 2$ ,  $2R \times 5$  and  $2UR \times 5$  (triploid  $2UR \times 2$  are not viable) (Fig. 1).

7. 300  $f_2$ -individuals out of 19  $F_1$ -progenies were analyzed cytologically. Shares of  $2R \times 2$ -,  $2R \times 5$ - and  $2UR \times 5$ -individuals are different between progenies and demonstrate different influence of  $F_1$  mother plants (with different numbers of acc.!) on pollen tube competition and egg cell production (Table 3, 4).

8. Increasing numbers of acc. in the sporophyte of  $F_1$  mothers generally further pollen tubes of 5x fathers and production of UR egg cells, but obstruct the development of haploid pollen tubes and R eggs. Only in plants with 2 acc. is this obstruction of haploid gametophytes reduced or absent (Table 5, 6). Normal growth of haploid pollen tubes and production of R egg cells are in turn essential components of good fertility (Fig. 2).

9. Plants without and with intra-individually instable numbers of acc. (1, 4—6) tend to show spontaneous chromosome aberrations in pollen meiosis, while those with stable numbers (especially 2) are normal (Table 8). This and other data suggest some relationship between acc. and chromosome reproduction.

10. Genetic influence of acc. in *Achillea* is most clearly expressed in the reaction system sporophyte  $\rightarrow$  gametophyte, but intensity and direction of this influence is not always the same, being only supplementary to the influence of basic plasmone and genome factors. As this idiotypic background is diverse on the population level, importance and function of acc. become relative and a balanced numerical polymorphism may be established.

11. Balance of acc. around optimum numbers 2 and 0 in the present artificial population over three generations P—F<sub>1</sub>—F<sub>2</sub> (230 2x individuals cytologically checked, Table 8) is maintained by counteraction of various mechanisms with direct and indirect regulative effect. These mechanisms are mostly dependent on dosage of acc., the system therefore is more or less selfregulative (Table 9, 10, Fig. 3).

12. Acc. chrom. are generally concentrated in structurally differentiated, allogamous and diploid populations. Their dosage may be quickly increased, stabilized or reduced by special cyto-mechanisms. As carriers of relatively unspecialized hetero- (and eu-)chromatin they may acquire various functions and serve as versatile supplementary members of the idiotype. Acc. tend to increase the plasticity of populations especially in regard to their genetic system (mutability, crossing capacities, development of ♂ and ♀ gametophytes etc.).

### Literatur

Um das Literaturverzeichnis möglichst raumsparend zu gestalten, wurde auf die Aufnahme derjenigen im Text genannten Arbeiten verzichtet, die schon im Handbuch von TISCHLER (1942—1951 und 1953—1957) sowie im Beitrag EHRENDORFER (1960a) angeführt sind.

ROSEMARK, N. O.: On accessory chromosomes in *Festuca pratensis*. V. Influence of accessory chromosomes on fertility and vegetative development. *Hereditas* (Lund) **43**, 211—235 (1957a).

BREWBAKER, J. L., and A. T. NATARAJAN: Centric fragments and pollen-part mutation of incompatibility alleles in *Petunia*. *Genetics* **45**, 699—704 (1960).

COLE, K.: The effect of various trisomic conditions in *Datura stramonium* on crossability with other species. *Amer. J. Bot.* **43**, 794—801 (1956).

EHRENDORFER, F.: Akzessorische Chromosomen bei *Achillea*: Struktur, cytologisches Verhalten, zahlenmäßige Instabilität und Entstehung. Zur Phylogenie der Gattung *Achillea*, V. *Chromosoma* (Berl.) (1960a, im Druck).

FRÖST, S.: Studies on the genetical effects of accessory chromosomes in *Centaurea scabiosa*. *Hereditas* (Lund) **44**, 112—122 (1958b).

HÅKANSSON, A.: Meiosis and pollen mitosis in rye plants with many accessory chromosomes. *Hereditas* (Lund) **43**, 603—620 (1957).

HARTE, C.: Untersuchungen über die Gonenkonkurrenz in den Samenanlagen bei *Oenothera* unter Verwendung der Letalfaktoren als Markierungsgene. III. Die genetische Komponente der Variabilität. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 715—728 (1958).

LONGLEY, A. E.: The origin of diminutive B-type chromosomes in maize. *Amer. J. Bot.* **43**, 18—22 (1956).

PALIWAL, R. L., and B. B. HYDE: The association of a single B-chromosome with male sterility in *Plantago coronopus*. *Amer. J. Bot.* **46**, 460—466 (1959).

- PFITZER, P.: Konstanz und Variabilität der Chromosomenzahl bei einigen Anthurien unter besonderer Berücksichtigung der B-Chromosomen. *Chromosoma* (Berl.) **8**, 545—572 (1957).
- RUTISHAUSER, A.: Chromosome distribution and spontaneous chromosome breakage in *Trillium grandiflorum*. *Heredity* **10**, 367—204 (1956b).
- SAMEJIMA, J.: Meiotic behaviour of accessory chromosomes and their distribution in natural populations of *Lilium medeoloides* A. GRAY. *Cytologia* (Tokyo) **23**, 159—171 (1958).
- TISCHLER, G.: Allgemeine Pflanzenkaryologie. 2. Hälfte: Kernteilung und Kernverschmelzung, 2. Aufl. Handbuch der Pflanzenanatomie, Bd. II. Berlin: Gebrüder Bornträger 1942—1951. — Erg.-Bd.: Angewandte Pflanzenkaryologie, Liefg. 1—5. Berlin: Gebrüder Bornträger 1953—1957.

Univ.-Doz. Dr. F. EHRENDORFER, Botanische Abteilung des Naturhistorischen Museums,  
Wien I., Burgring 7



## Autorenverzeichnis des 91. Bandes

- AACH, H. G., Vergleich des Eiweißanteiles des Wildstammes vom Tabakmosaikvirus mit dem einer Temperaturmutante. S. 312
- AUERBACH, C., and E. M. SONBATI, Sensitivity of the *Drosophila* testis to the mutagenic action of mustard gas. S. 237 — s. SONBATI, E. M. S. 253
- BERGFELD, R., Mutationsauslösung durch Chemikalien bei *Antirrhinum majus* L. II. S. 355
- BIANCHI, A., and G. MARCHESI, The surface of the leaf in normal and glossy maize seedlings. S. 214
- BONNER, D. M. s. ESSER, K. and J. A. DE MOSS. S. 291
- BRESCH, C. s. HAUSMANN, R. S. 266
- CASPARI, E. s. EGELHAAF, A. S. 373
- CLARK, A. M., The mutagenic activity of some pyrolizidine alkaloids in *Drosophila*. S. 74.
- CLELAND, R. E., The S-factor situation in a small sample of an *Oenothera* (*Raimannia*) *heterophylla* population. S. 303
- DAVIES, D. ROY, and E. T. WALL, Effect of gamma radiation on interspecific incompatibility within the genus *Brassica*. S. 45
- DE MOSS, J. A. s. ESSER, K. and D. M. BONNER. S. 291
- EGELHAAF, A., und E. CASPARI, Über die Wirkungsweise und genetische Kontrolle des Tryptophanoxydasesystems bei *Ephestia kühniella*. S. 373
- EHRENDORFER, FR., Akzessorische Chromosomen bei *Achillea*: Auswirkungen auf das Fortpflanzungssystem, Zahlen-Balance und Bedeutung für die Mikro-Evolution. (Zur Phylogenie der Gattung *Achillea*, VI.) S. 400
- ESSER, K., J. A. DE MOSS and D. M. BONNER, Reverse mutations and enzyme heterogeneity. S. 291
- GOTTSCHALK, W., und N. HEIDE, Über das Auftreten tripolarer Spindeln und mehrkerniger Pollenmutterzellen in abregulierenden polyploiden Pflanzen. S. 27
- GOWANS, C. SHIELDS, Some genetic investigations on *Chlamydomonas eugametos*. S. 63
- HÄNSEL, H., Beobachtungen über albinotische und vireszente Chlorophyllaberranten und deren Nachkommen bei Gerste (*Hordeum vulgare* convar. *Distichon*). S. 358
- HAUSMANN, R., und C. BRESCH, Zum Problem der genetischen Rekombination von Bakteriophagen. II. Versuch einer experimentellen Unterscheidung von paarweiser und kompletter Kooperation. S. 266
- HARM, W., Vergleichende Untersuchungen an HNO<sub>2</sub>-inaktivierten und UV-inaktivierten Bakteriophagen T 4. S. 52
- HEIDE, N. s. GOTTSCHALK, W. S. 27
- HOUGAS, R. W., s. WANGENHEIM, K.-H. v. and S. J. PELOQUIN. S. 391
- JOUSSEN, H., und J. KEMPER, Ein neues Interferenzmodell zur Aufstellung von Tetraden-Kartierungsfunktionen. S. 350
- KEMPER, J. s. JOUSSEN, H. S. 350
- KIRCHEISEN, G., Chromosomenbestand und Geschlecht bei heteroploiden Nachkommen von *Sphaerocarpus donnellii*. S. 94 — Die Bildung von Dyaden und Monaden sowie das Geschlecht diploider Gametophyten bei *Sphaerocarpus donnellii*. S. 106
- KOCHER, W., Untersuchungen zur Genetik und Pathologie der Entwicklung von 8 Labyrinthmutanten (*deaf-waltzer-shaker*-Mutanten) der Maus (*Mus musculus*). S. 114
- KÜHN, A., Genetisch bedingte Mosaikbildungen bei *Ephestia kühniella*. S. 1
- KUMINEK, K., Die Genetik einer neu aufgetretenen spontanen Kurzschwanzmutation bei der Hausmaus. S. 182
- LÖBBECKE, E.-A., und I. MÜLLER, Das somatische Mutantenspektrum von *Ephestia kühniella* Z. bei verschiedenen Dosen weicher 10 kV- und mittelharter 100 kV-Röntgenstrahlen sowie der harten <sup>60</sup>Co-Strahlung. S. 338
- MALY, R., Die Normalisierung genetisch bedingter Defekte der Zelltrennung bei *Paramaecium aurelia* durch Sauerstoffmangel und Kohlenmonoxyd. S. 226 — Die Wirkung eines Komplexbildners und von Metallionen auf die Ausprägung des *snaky*- und *Monstra*-Charakters bei *Paramaecium aurelia*. S. 333
- MARCHESI, G. s. BIANCHI, A. S. 214
- MENKE, W., Über ein Modell der Plastidenmutation. S. 152
- MORRISON, J. W., The monosomic analysis of growth habit in winter wheat. S. 141
- MOSIG, G., Zur Genetik von *Petunia hybrida*. I. Die Selbststerilität. S. 158

- MOSIG, G., Zur Genetik von *Petunia hybrida*. II. Die Analyse von Genen der Anthoxanthin- und Anthocyanbildung in der Blüte. S. 164
- MÜLLER, I. s. LÖBBECKE, E.-A. S. 338
- MUNDRY, K. W., Mutationsuntersuchungen am Tabakmosaikvirus *in vitro*. I. Die Abhängigkeit des Erfolgs der Mutagenese mit  $\text{HNO}_2$  von der Mutationsrichtung. S. 81
- Mutationsuntersuchungen am Tabakmosaikvirus *in vitro*. II. Versuche zum Problem der Mutagenese durch UV-Bestrahlung reiner Viruspräparate. S. 87
- NAKADA, D., E. STRELZOFF, R. RUDNER and F. J. RYAN, Is DNA replication a necessary condition for mutation? S. 210
- PATEMAN, J. A., Nuclear and cytoplasmic effects of ultraviolet irradiation in *Neurospora crassa*. S. 380
- PELOQUIN, S. J. s. WANGENHEIM, K.-H. v. and R. W. HOUGAS. S. 391
- RUDNER, R., and F. J. RYAN, Phenocopies induced by thymine in *Escherichia coli*. S. 220
- s. NAKADA, D., E. STRELZOFF and F. J. RYAN. S. 210
- RYAN, F. J. s. NAKADA, D., E. STRELZOFF and R. RUDNER. S. 210
- s. RUDNER, R. S. 220
- SCHWEMMLE, J., Keimversuche auf genetischer Grundlage. III. Der Einfluß des Faktors *ch* auf die Keimung. S. 277
- SONBATI, E. M., and C. AUERBACH, The brood pattern for intragenic and intergenic changes after mustard gas treatment of *Drosophila* ♂♂. S. 253
- s. AUERBACH, C. S. 237
- STRELZOFF, E. s. NAKADA, D., R. RUDNER and F. J. RYAN. S. 210
- TRAUT, H., Über die Abhängigkeit der Rate strahleninduzierter Translokationen und rezessiv geschlechtsgebundener Letalfaktoren vom Stadium der Spermatogenese bei *Drosophila melanogaster*. S. 201
- Zum Problem der Wirkung von verfüttertem Eisensaccharat auf die durch Röntgenstrahlen induzierte Mutationsrate bei *Drosophila melanogaster*. S. 325
- TRAUTNER, T. A., The influence of the multiplicity of infection on crosses with bacteriophage T1. S. 259
- Das Verhalten nitritinaktivierter T1-Phagen in Kreuzungs- und Multiplizitätsreaktivierungs-Versuchen. S. 300
- Genetische und physiologische Beziehungen zwischen den Bakteriophagen T1 und D20. S. 317
- WALL, E. T. s. DAVIES, D. ROY. S. 45
- WANGENHEIM, K.-H. v., S. J. PELOQUIN and R. W. HOUGAS, Embryological investigations on the formation of haploids in the potato (*Solanum tuberosum*). S. 391
- ZIEGLER, I., Zur Feinstruktur der Augengranula bei *Drosophila melanogaster*. S. 206